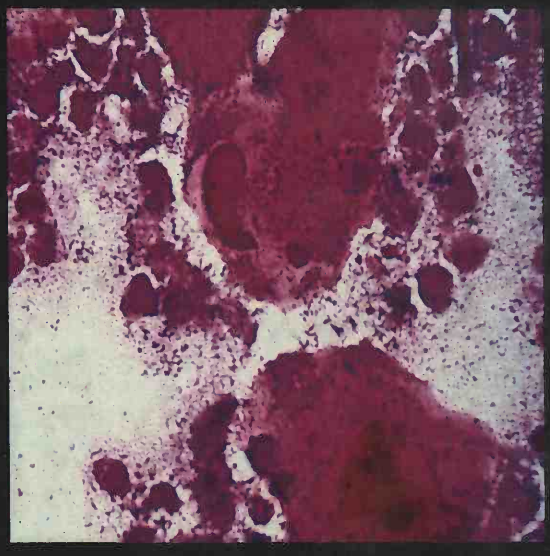
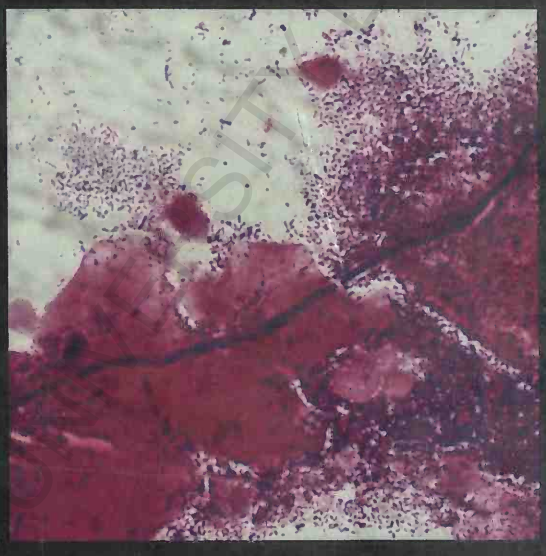
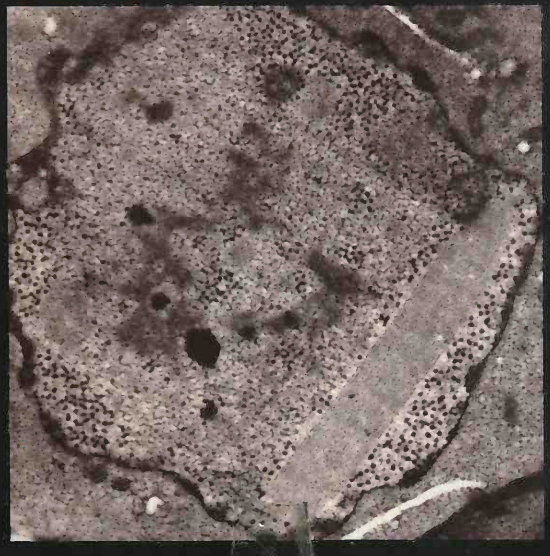
Mariana Carmen Chifiriuc Grigore Mihăescu Veronica Lazăr

MICROBIOLOGIE ȘI VIROLOGIE MEDICALĂ

editura universității din bucurești®

CARMEN CHIFIRIUC GR. MIHĂESCU VERONICA LAZĂR

88,5 lei

MICROBIOLOGIE ŞI VIROLOGIE MEDICALĂ

UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

Cuvânt înainte .....

PARTEA I. BACTERIOLOGIE MEDICALĂ 13

INTRODUCERE 13

1. **SCURT ISTORIC AL MICROBIOLOGIEI MEDICALE** 14
2. **STRUCTURA şi FUNCŢIILE CELULEI BACTERIENE** 20

2.1. Peretele celular 20

2.1.1. Structura moleculară a peretelui celular la bacteriile Gram pozitive 21

2.1.2. Peretele celular la bacteriile Gram negative 24

2.1.3. Peretele celular la Archaea 24

2.1.3.1. Structura chimică a moleculei de LPS 26

2.1.3.2. Spaţiul periplasmic 27

2.1.4. Peretele celular acido-rezistent al micobacteriilor 28

2.1.5. Funcţiile peretelui celular 28

2.1.6. Protoplaştii 29

2.2. Membrana plasmatică 30

2.2.1. Structura membrane plasmatice 30

2.2.2. Funcţiile membranei plasmatice 34

2.2.3. Mecanismele fiziologice ale permeabilităţii membranei 34

2.3. Mezosomul 35

2.4. Citoplasma 36

2.5. Nucleoidul bacterian 37

2.54.1. Organizarea fizică a cromosomului 37

2.6. Ribosomii 39

2.6.1. Particularităţile sintezei proteinelor la bacterii 40

2.6.2. Secreţia proteinelor extracelulare la bacterii 41

2.7. Sporul 43

2.7.1. Structura internă a endosporului 45

2.7.2. Particularităţile biochimice ale sporului 45

2.8. Incluziile 46

2.9. Glicocalixul 47

2.9.1. Capsula 47

2.9.1.1. Natura chimică a materialului capsular 48

2.9.2. Glicocalixul comportamental 49

2.10. Flagelul 51

2.10.1. Structura flagelului 51

2.10.2. Motilitatea şi chimiotaxia 52

2.11. Fimbriile 52

2.12. Pilii 54

2.13. Dinamica unei culturi bacteriene discontinui 54

2.14. Metabolismul bacterian 58

2.14.1. Particularităţile generale ale metabolismului bacterian 58

2.14.2. Metabolismul energetic bacterian 59

2.14.3. Tipuri de metabolism energetic in funcţie de acceptorul final de electroni 59

2.14.3.1. Respiraţia aerobă bacteriană 61

2.14.3.2. Respiraţia anaerobă 63

2.14.3.3. Fermentaţia 64

2.14.4. Catabolismul lipidelor 68

2.14.5. Catabolizarea compuşilor organici cu azot 68

2.14.6. Catabolismul compuşilor aromatici 69

BCU "IOAN SLAVICI" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. MICROBIOTA NORMALĂ A ORGANISMULUI UMAN 71
3.1. Colonizarea şi succesiunea microorganismelor la om 72
3.2. Microbiota normală a tractului respirator şi a cavităţii orale 73
3.2.1. Implicaţiile microbiotei orale în patologia dentară 75
3.3. Habitatele microbiotei gastrointestinale 80
3.4. Microbiota normală a tractului urogenital 83
3.5. Microbiota normală a pielii 84
3.6. Microorganismele probiotice 84
3.7. Gnotobioza şi animalele gnotobiotice 85
3.7.1. Caracteristicile animalelor "*germ-free*" 85
3.8. Rolurile microbiotei normale 86
4. PROPRIETĂŢILE MICROORGANISMELOR PATOGENE: PATOGENITATEA ŞI VIRULENŢA BACTERIANĂ 88
4.1. Definiţii 88
4.2. Infecţiozitatea 90
4.2.1. Adezinele bacteriene 90
4.2.2. Biofilmele microbiene 94
4.3. Sideroforii – factori de virulenţă 99
4.4. Agresivitatea (Invazivitatea) 103
4.5. Toxigenitatea 106
4.6. Proprietăţi metabolice particulare implicate în virulenţa bacteriană 123
4.7. Reglarea expresiei factorilor de virulenţă 126
4.8. Evoluţia bacteriilor patogene 127
4.9. Relaţia dintre patogenitate şi parazitism 128
4.10. Microorganismele oportuniste 129
5. EVOLUŢIA PROCESULUI INFECŢIOS 130
5.1. Etapele procesului infecţios 130
5.2. Condiţiile de apariţie a procesului infecţios 141
5.3. Modalităţi de evoluţie a procesului infecţios 144
6. COCI PIOGENI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ 147
6.1. Coci Gram pozitivi, catalază pozitivi, aerobi de importanţă medicală. Familia *Micrococcaceae* 147
6.1.1. Genul *Staphylococcus* 147
6.2. Coci Gram pozitivi, catalazănegativi, de importanţă medicală. Familia *Streptococcaceae* 162
6.2.1. *Streptococcus pyogenes* 163
6.2.2. *Streptococcus agalactiae* 168
6.2.3. *Streptococii de grup C şi G* 169
6.2.4. *Streptococcus pneumoniae* 169
6.2.5. Genul *Enterococcus* 172
6.2.6. Alte genuri şi specii de streptococi 176
6.2.7. Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor streptococice 177
6.3. Coci piogeni Gram negativi de importanţă medicală – Familia *Neisseriaceae* 180
6.3.1. Genul *Neisseria* 180
6.3.1.1. *Neisseria gonorrhoeae* 182
6.3.1.2. *N. meningitidis* 185
6.3.1.3. *Alte specii de Neisseria* 186
6.3.2. *Moraxella catarrhalis* 187
6.3.3. *Kingella denitrificans* 187
7. BACILI GRAM NEGATIVI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ 189
7.1. Familia *Enterobacteriaceae* 189
7.1.1. Genul *Escherichia* 191
7.1.2. Genul *Salmonella* 199
7.1.3. Genul *Shigella* 206
7.1.4. *Citrobacter freundii* 211
7.1.5. Grupul *Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia* (KEHS) 211
7.1.6. Grupul *Proteus Morganella Providencia* 212
7.1.7. Genul *Edwardsiella* 214
7.1.8. Genul *Levinea (Citrobacter) malonatica* 214
7.1.9. Genul *Kluyvera* 214
7.1.10. Genul *Buttiauxella* 214
7.1.11. Genul *Yersinia* 215

SOCOLA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.2. Bacili Gram negativi nonfermentativi opportunisti 219
7.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* 220
7.2.2. *Ps. Mallei* 226
7.2.3. *Ps. (Burkholderia) pseudomallei* 226
7.2.4. *Burkholderia cepacia* 226
7.2.5. *Stenotrophomonas maltophilia* 228
7.2.6. Genul *Acinetobacter* 228
7.2.7. Alte specii de bacili Gramnegativi 230
7.3. Familia *Pasteurellaceae* 233
7.3.1. Genul *Pasteurella* 233
7.3.2. Genul *Haemophylus* 234
7.4. *Bordetella pertussis* 237
7.5. Genul *Brucella* 240
7.6. *Francisella tularensis* 241
7.7. *Legionella* 244
8. BACILI GRAMPOZITIVI SPORULAȚI. FAMILIA *BACILLACEAE* 248
8.1. *Bacillus anthracis* 249
8.2. *B. cereus* 250
8.3. Genul *Clostridium* 251
9. BACILI GRAMPOZITIVI NESPORULAȚI 262
9.1. Genul *Corynebacterium* 262
9.2. Genul *Listeria* 265
9.3. *Erysipelothrix rusiopathiae* 270
10. ACTINOBACTERII 271
10.1. *Nocardia asteroides* 271
10.2. Genul *Mycobacterium* 272
11. INFECȚII PRODUSE DE BACTERII ANAEROBE REZIDENTE ÎN MICROBIOTA NORMALĂ 281
12. BACTERII SPIRALATE DE IMPORTANȚĂ MEDICALĂ 285
12.1. Vibrioni. Familia *Vibrionaceae* 285
12.1.1. Genul *Vibrio* 285
12. 1.2. Genul *Aeromonas* 292
12.1.3. Genul *Photobacterium* 294
12.2. Spirili 294
12.2.1. *Campylobacterii* 294
12.2.2. Familia *Helicobacteriaceae* 298
12.3. Spirochete 302
12.3.1. *Borrelia* 303
12.3.2. *Treponema* 306
12.3.3. *Leptospira* 310
13. BACTERII STRICT INTRACELULARE 315
13.1. *Chlamidii* 317
13.2. *Ricketsii* 321
13.3. *Coxiella burnetii* 322
13.4. Genul *Ehrlichia* 323
14. MICOPLASME 324
15. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR MICROBIENE 328
15.1. Noțiuni de asigurarea calității în bacteriologia clinică 328
15.2. Tipuri de produse patologice recoltate în scopul unei analize microbiologice 348
15.3. Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator 352
15.4. Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator inferior 355
15.5. Examenul citobacteriologic al urinii (ECU) 357
15.6. Examenul bacteriologic al secrețiilor și exsudatelor ano-genitale 360
15.7. Diagnosticul bacteriologic al materiilor fecale. Coprocultura 363
15.8. Hemocultura 367
15.9. Examenul bacteriologic al dispozitivelor intravasculare (catetere, camere implantabile) 372
15.10. Examenul citochimic și bacteriologic al lichidului cefalorahidian 373
15.11. Examenul bacteriologic al lichidelor de puncție (lichide purulente, serozități) 376
15.12. Analiza microbiologică a exsudatelor purulente, a secrețiilor de plagă și a abceselor 377
15.13. Examenul bacteriologic al lichidului de dren 379
15.14. Examenul bacteriologic al prelevatelor oculare 379

UMF CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15.15. Examenul bacteriologic al prelevatelor perinatale 381
15.16. Izolarea şi identificarea bacteriilor anaerobe 382
15.17. Diagnosticul infecţiilor cu micobacterii 384
15.18. Evidenţierea potenţialului de patogenitate şi virulenţă prin teste *in vitro* 388
16. TERAPIA ANTIMICROBIANĂ 395

ARTEA A II-A. VIROLOGIE MEDICALĂ
17. NOŢIUNI INTRODUCTIVE 432
17.1. Modelul general de structură a virionului 433
17.1.1. Capsida 434
17.1.2. Învelişul viral (peplosul) 434
17.1.3. Genomul viral. Organizarea fizică 435
17.1.4. Genomuri virale ARN segmentate 437
17.1.5. Modalităţi particulare de codificare a informaţiei genetice la virusuri 437
17.1.6. Infecţiozitatea acizilor nucleici 440
17.2. Definirea conceptului modern de virus 440
17.3. Natura virusurilor 441
17.4. Simetria virusurilor 443
17.4.1. Simetria helicală 444
17.4.2. Simetria icozaedrică 444
17.4.3. Probleme legate de modul de construcţie a virionilor icozaedrici 445
17.4.4. Simetria binară 446
18. MULTIPLICAREA VIRUSURILOR 447
18.1. Iniţierea procesului infecţios 449
18.2. Pătrunderea virusului în celulă (infecţia propriu-zisă) 450
18.3. Sinteza ARNm viral 453
18.3.1. Sinteza ARNm la dezoxiribovirusuri 454
18.3.2. Originea ARNm la ribovirusuri 455
18.4. Biosinteza proteinelor virale timpurii 457
18.5. Replicarea genomului viral ADN 457
18.6. Replicarea şi transcrierea genomului viral ARN 461
18.6.1. Replicarea şi transcrierea ARN printr-un intermediar ADN 463
18.7. Biosinteza proteinelor tardive 464
18.7.1. Transportul şi prelucrarea proteinelor 465
18.8. Asamblarea (morfogeneza) şi eliberarea virionilor 464
19. TIPURI DE RELAŢII VIRUS-CELULĂ 469
19.1. Patologia celulelor infectate cu virusuri 470
19.2. Mecanismele moleculare ale efectului citopatic 471
19.2.1. Modificări metabolice 471
19.2.1.1. Modificări ale metabolismului acizilor nucleici celulari 472
19.2.1.2. Modificări ale metabolismului proteinelor celulare 473
19.2.2. Pierderea funcţiilor membranelor celulare 474
19.2.3. Modificări ale citoscheletului 475
19.2.4. Apoptoza 475
19.2.5. Apariţia corpilor de incluzie 476
20. RELAŢII DINTRE VIRUSURI ŞI ORGANISME 477
20.1. Căile de intrare a virusurilor 477
20.2. Tropismul viral 479
20.2.1. Neurotropismul 479
20.2.2. Enterotropismul 481
20.3. Tipuri de infecţii *in vivo* 482
20.3.1. Persistenţa virală 483
20.3.2. Mecanismele persistenţei virale 484
20.3.3. Importanţa infecţiilor persistente 485
21. FAMILII DE VIRUSURI CU SEMNIFICAŢIE CLINICĂ 487
21.1. Familia *Orthomyxoviridae* 487
21.2. Familia *Paramyxoviridae* 498
21.3. Familia *Rhabdoviridae* 507
21.4. Familia *Filoviridae* 513
21.5. Familia *Picornaviridae* 514
21.6. Arbovirusuri. Familia *Flaviviridae* 524

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

21.7. Familia *Asfarviridae* 534
21.8. Familia *Togaviridae* 535
21.9. Familia *Bunyaviridae* 538
21.10. Familia *Arenaviridae* 540
21.11. Familia *Coronaviridae* 543
21.12. Familia *Reoviridae* 546
21.13. Familia *Adenoviridae* 551
21.14. Familia *Herpesviridae* 558
21.15. Familia *Parvoviridae* 573
21.16. Familia *Poxviridae* 579
21.17. Familia *Hepadnaviridae* 584
21.18. Familia *Retraviridae* 593
21.19. *Mimivirus* 612
22. RĂSPUNSUL IMUN ANTIVIRAL 614
22.1. Mecanisme nespecifice (înnăscute) de protecţie antivirală 614
22.1.1. Imunitatea nespecifică mediată celular 614
22.1.2. Interferonii şi mecanismele acţiunii lor 615
22.2. Răspunsul imun antiviral specific (adaptativ) 622
22.2.1. Imunitatea mediată humoral 623
22.2.2. Protecţia antivirală a mucoaselor 625
22.2.3. Imunitatea mediată celular 626
22.2.4. Mecanisme prin care virusurile evită efectorii răspunsului imun 628
22.2.4.1. Toleranţa şi/ sau diminuarea reactivităţii imunitare 629
22.2.3.2. Variaţia antigenică 630
23. NOŢIUNI GENERALE DE ONCOGENEZĂ 632
23.1. Agenţii fizici şi chimici ai malignizării 633
23.2. Etapele procesului de malignizare 634
23.3. Caracterele generale ale celulelor normale 635
23.4. Particularităţile funcţionale ale celulelor maligne 637
23.5. Oncogenele celulare 641
23.6. Oncogeneza virală 644
23.7. Retravirusuri oncogene transductoare şi netransductoare 646
23.6.1. Oncogenele virusurilor transductoare 646
23.6.2. Mecanismele oncogenezei cu retravirusuri 648
23.8. Dezoxiribovirusuri oncogene 651
23.8.1. Transformarea cu poliomavirusuri 653
23.8.2. Transformarea cu papilomavirusuri 656
23.8.3. Transformarea cu adenovirusuri 661
23.8.4. Transformarea cu herpesvirusuri 662
23.8.5. Transformarea cu virusul hepatitei B 663
24. AGENŢI INFECŢIOŞI SUBVIRALI 665
24.1. Virusul hepatitei D 665
24.1.1. Proteine codificate de virus 666
24.2. Viroizii 667
24.2.1. Patogenitatea viroizilor 669
24.3. Virusoizii 670
24.4. Virino 671
24.5. Prionii 671
24.5.1. Proteina neuronală PrP^c 672
24.5.2. Originea şi apariţia prionilor 673
24.5.3.Transmiterea experimentală a prionilor 675
24.5.4. Patogenitatea prionilor 675
25. VACCINURI VIRALE 678
25.1. Metode de atenuare a virulenţei 678
25.2. Vaccinuri inactivate 679
25.3. Vaccinuri subunitare 680
25.3.1. Tehnici moderne de obţinere a vaccinurilor subunitare 680
26. METODE DE STUDIU ŞI DE DIAGNOSTIC VIRAL 684
26.1. Metode directe 684
26.1.1. Metode microscopice 684
26.1.2. Metode de cultivare a virusurilor 685

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIO.CHIM

26.2. Metode indirecte 687
26.2.1. Metode serologice 687
26.2.1.1. Evidenţierea anticorpilor 687
26.2.1.2. Evidenţierea antigenelor virale 689
26.2.2. Metode moleculare. Detectarea acizilor nucleici 690
26.3. Cuantificarea multiplicării virale 693
26.4. Purificarea şi identificarea virusurilor 693
26.5. Acţiunea factorilor fizici şi chimici asupra virusurilor 694
27. CHIMIOTERAPIA INFECŢIILOR VIRALE 696
27.1. Analogii nucleozidelor 697
27.2. Amine ciclice 701
27.3. Inhibitori ai sintezei proteinelor: β-thiosemicarbazone 701
27.4. Foscarnet 702
27.5. Chimioterapia infecţiei cu HIV 702
27.6. Imunoterapia 705
27.7. Rezistenţa virală la agenţii chimioterapeutici 706

PARTEA A III-A. MICOLOGIE MEDICALĂ
28. NOŢIUNI INTRODUCTIVE DE MICOLOGIE 710
28.1. Caracterizarea generală a regnului Fungi 710
28.2. Tipuri de infecţii fungice 714
28.3. Fungi patogeni la om 715
28.3.1. Dermatomicete 715
28.3.1.1. Agenţi etiologici ai micozelor cutanate 715
Microsporum sp.
Trichophyton sp.
Epidermophyton sp.
28.3.1.2. Agenţi etiologici ai micozelor subcutanate 724
Sporothrix schenckii
Madura sp.
Madurella sp.
Nattrassia mangiferae
Alternaria sp.
Bipolaris sp.
Exserohilum sp.
Cladophialophora carrionii
Fonsecaea sp.
Curvularia sp.
Exophiala sp.
Phialophora verrucosa
Scedosporium sp.
28.3.2. Agenţi etiologici ai micozelor sistemice primare 725
Histoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Blastomyces dermatitidis
28.3.3. Agenţi etiologici ai micozelor oportuniste 728
Candida sp.
Cryptococcus neoformans
Pneumocystis jiroveci (*Pn. carinii*)
Aspergillus
Acremonium
Geotrichum candidum
Onychocola canadensisi
Scopulariopsis
Paecilomyces
Penicillium
Trichoderma viride
Zigomicoze (mucormicoze)
28.4. Terapia infecţiilor fungice 737
Prescurtări 745

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuvânt înainte

Infecţiile virale, bacteriene şi fungice, în special cele cu transmitere aeriană, hidrică sau prin alimente de origine vegetală şi animală contaminate, înregistrează o frecvenţă din ce în ce mai mare, îndeosebi în marile aglomerări urbane.

Microbiologia medicală, în pofida denumirii, nu este un domeniu de activitate care aparţine exclusiv medicilor, deoarece la demersul actului medical participă, cu sarcini din ce în ce mai complexe, personalul laboratorului de microbiologie, care de regulă are o pregătire în domeniul ştiinţelor biologice.

În Facultatea de Biologie a Universităţii Bucureşti, disciplinele de profil bio-medical sunt reprezentate de Microbiologia medicală, Imunologie clinică şi Virologie, care se bucură de audienţă şi aprecieri favorabile din partea cursanţilor.

Microbiologie şi Virologie medicală este primul manual de profil bio-medical care apare în Universitatea Bucureşti şi după cunoştiinţa noastră, disciplina de Microbiologie-Imunologie-Virologie a Facultăţii de Biologie din Bucureşti este prima instituţie de profil din ţară care şi-a propus şi a realizat acest deziderat. Ciclurile de masterat ale facultăţii noastre sunt frecventate şi de absolvenţi ai altor universităţi, ale căror programe nu cuprind discipline de profil bio-medical, ceea ce sporeşte interesul şi atractivitatea pentru prelegerile noastre.

Manualul de *Microbiologie şi Virologie medicală* are o abordare biologică a conţinutului şi a modului de prezentare a materialului ştiinţific, adecvat şi adaptat pregătirii de bază. Autorii au fost preocupaţi, preponderent, de descrierea particularităţilor structurale şi funcţionale ale agenţilor infecţioşi (virusuri, bacterii, fungi) şi corelarea acestora cu mecanismele patogenităţii şi patologia specifică.

Manualul de *Microbiologie şi Virologie medicală*, bogat ilustrat color şi extins pe 748 pagini, se adresează, în primul rând studenţilor Facultăţii de Biologie, care audiază cursuri de profil, dar în egală măsură, biologilor şi medicilor cu specializare în microbiologia clinică. În egală măsură, manualul este accesibil şi necesar oricărui student al facultăţii noastre, deoarece noţiunile specifice de profil bio-medical sunt precedate de prezentarea celor fundamentale, cu scopul de a integra într-un tot unitar şi de a accentua relaţia directă dintre structură, funcţie şi mecanismele patogenităţii agenţilor infecţioşi, precum şi dinamica răspunsului imun.

Manualul de *Microbiologie şi Virologie medicală* cuprinde un capitol special, care constituie un adevărat ghid de bună practică pentru laboratorul clinic de *Bacteriologie*, elaborat în acord cu standardele internaţionale curente.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA I. BACTERIOLOGIE MEDICALĂ

INTRODUCERE

Microbiologia medicală este o ramură a Microbiologiei generale, care se ocupă cu studiul microorganismelor patogene. Acestea reprezintă doar o mică parte, cca. 550 de specii, din totalitatea microorganismelor, care constituie cca. ½ din biomasa Terrei aflndu-se la începutul şi la sfârşitul lanţurilor trofice. Microorganismele patogene sunt dotate cu capacitatea de a iniţia un proces infecţios, atunci când se îndeplinesc anumite condiţii:

1. un număr corespunzător de microorganisme;
2. poartă adecvată de intrare în organismul gazdă;
3. receptivitatea organismului gazdă;
4. condiţia fiziologică şi imunologică a gazdei.

Microbiologia medicală integrează domeniile Imunologiei, Bacteriologiei, Virologiei şi Parazitologiei, fiecare cu un nivel considerabil de dezvoltare independentă. Liantul acestor domenii este identificarea agenţilor etiologici ai maladiilor infecţioase, precum şi a mecanismelor reacţiilor imunitare ale gazdei.

Deşi antibioticele şi vaccinurile au eradicat, au eliminat sau au limitat multe maladii infecţioase, ameninţarea acestora rămâne, datorită emergenţei unor noi agenţi patogeni, selectaţi dintre agenţii oportunişti, evoluând pe terenul favorabil al unor gazde imunodeprimate din multiple cauze, sau al unor tulpini cu nivel înalt de rezistenţă la antibiotice, care generează mari dificultăţi terapeutice, uneori insurmontabile. Unei serii de boli cronice (scleroza în plăci, diabetul insulino-dependent, sindromul oboselii cronice, rectocolită hemoragică, encefalite, meningite, boala Wipple, sindromul Guillain-Barré) i se atribuie astăzi o etiologie infecţioasă. Unele maladii infecţioase (SIDA, rabia) rămân în prezent încă incurabile.

Schimbările globale au influenţat, de asemenea, arealul de răspândire al anumitor agenţi patogeni, în timp ce patogenii animali şi-au pierdut specificitatea de specie şi au infectat omul, adaptându-se la noua gazdă şi generând astfel fenotipuri adaptate speciei umane.

În prezent, principalele cauze de mortalitate şi morbiditate la nivel global sunt: boala diareică acută (3,3 milioane cazuri); bolile respiratorii acute (4,4 milioane decese anual); tuberculoza (1,7 milioane cazuri noi şi până la 3 milioane decese anual); SIDA, hepatitele virale, rujeola (1 milion decese anual).

Scopul acestui manual este de a prezenta noţiunile de bază despre agenţii patogeni care produc infecţii, mecanismele moleculare ale virulenţei specifice, mecanismele imunităţii antiinfecţioase, precum şi modalităţile de diagnostic de laborator al infecţiilor bacteriene şi fungice.

Cartea se adresează, în primul rând, studenţilor Facultăţii de Biologie, masteranzilor, precum şi biologilor,biochimiştilor, chimiştilor şi medicilor care lucrează în laboratoarele şi instituţiile de profil biomedical.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. SCURT ISTORIC AL MICROBIOLOGIEI MEDICALE

Basorelief egiptean reprezentând un personaj cu sechele de poliomielită.

Bolile infecţioase (definite astăzi prin evoluţie rapidă, posibilitatea de propagare de la un organism la altul, indice mare de morbiditate şi mortalitate) au fost cunoscute încă din Antichitate (pe un basorelief egiptean, apare un personaj masculin care prezintă sechele de poliomelită).

Istoricii medicinii afirmă chiar că fiecare epocă este caracterizată de o maladie infecţioasă definitorie: lepra, pentru Antichitate, ciuma, în Evul Mediu, sifilisul în perioada Romantismului, bolile cronice în epoca actuală.

Ipotezele asupra originii infecţioase a unor maladii sunt foarte vechi. Există dovezi conform cărora pentru a alege locurile unde să se contruiască spitalele, Avicenna, un medic al antichităţii, atârna în diferite locuri bucăţi de carne crudă, aşteptând să vadă unde se alterează cel mai greu. Hypocrates (400 î.Hr.) este cel care afirmă că la geneza bolilor participă două tipuri de factori: intrinseci (constituţia bolnavului) şi extrinseci (alte elemente de natură nocivă), concepţie care a stat la baza teoriei miasmelor (grec: *miasma* = murdărie, emanaţie putridă), formulată de către Varon (100 î.Hr.), teorie conform căreia bolile sunt cauzate de animale foarte mici, invizibile, care pătrund prin gură şi nări. Aristotel (sec. 3 î.e.n.) observă că organismele vii se pot dezvolta pe materiale inerte.

Avicenna (sec. 11 î. Ch.).

Hipocrate.

Marcus Terentius Varro.

Aristotel (sec. 4 î.ch.).

Fracastorius.

Hieronymus Fracastorius (1546) denumeşte *contagium vivum,* agentul sifilisului sau „seminaria morbi" şi menţionează pentru prima dată implicarea obiectelor inanimate în transmiterea bolilor epidemice.

În aceeaşi perioadă, lui Hans Zaccharias Janssen (sau Sacharias Jansen) i se atribuie primele invenţii care aveau să stea la baza microscopului. Robert Hooke (sec. 16) realizează primele desene ale unor materiale biologice observate la microscop, publicate în lucrarea *Micrographia.*

Hans Zaccharias Jansen.

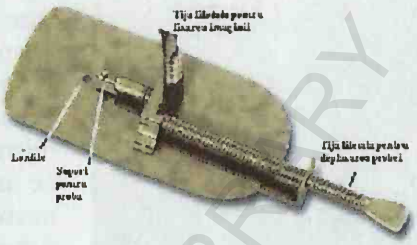
Portretul lui Robert Hooke.

Pagini şi desene din *Micrographia* lui R. Hooke.

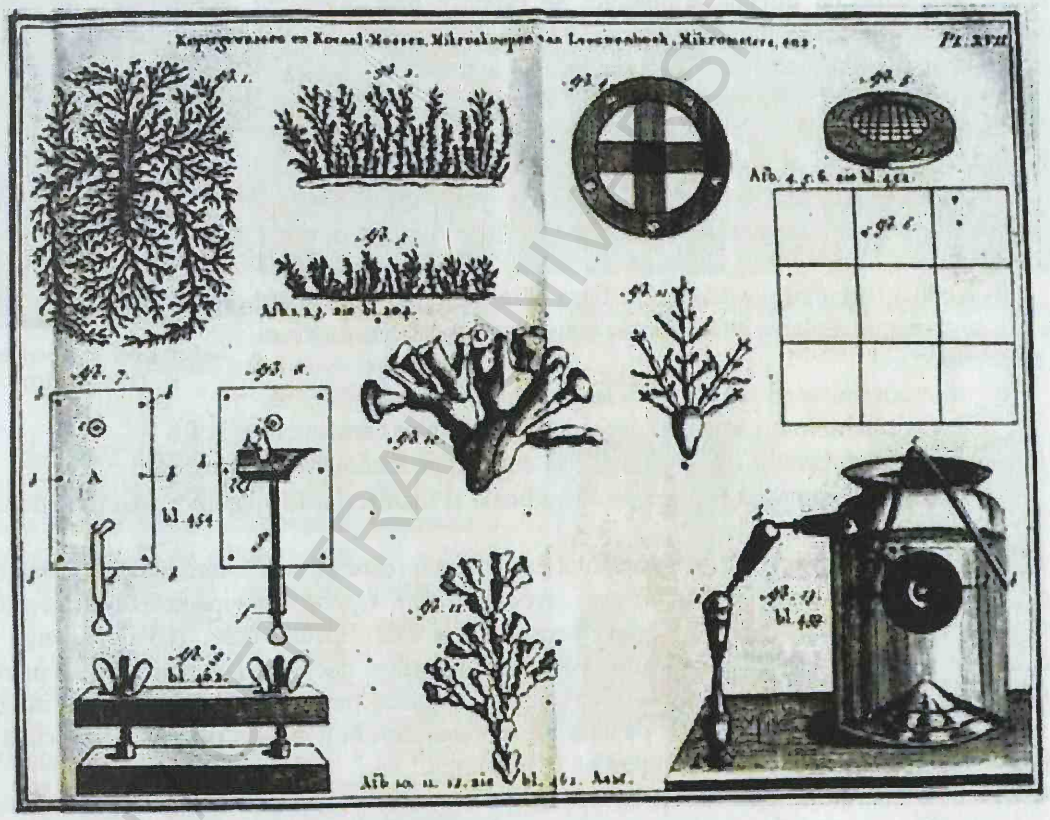
Anton Philips van Leeuwenhoek (sec. 17) a fost primul care a observat microorganismele cu ajutorul unui aparat de construcție proprie și le-a denumit "animalcule".

Anton van Leeuwenhoek, părintele microscopului optic.

Primul microscop compus (cca 1595).



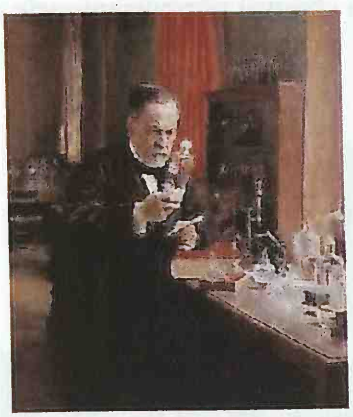
Microscopul lui Leeuwenhoek.



Desene de corali realizate de Leeuwenhoek prin vizualizare la microscop și redarea dimensiunilor acestora exprimate în micrometri.

Ipoteza lui Francastor a fost confirmată de Louis Pasteur (sec. 19), prin *teoria germenilor*, conform căreia orice boală infecțioasă este rezultatul acțiunii vitale a unui microorganism care parazitează un alt organism. Pasteur a pus așadar bazele teoretice ale *Microbiologiei medicale umane* și *veterinare*, demonstrând cauzele producerii maladiilor infecțioase. Până atunci se cunoștea caracterul transmisibil (contagios) al acestora, dar nu se știa că ele sunt rezultatul pătrunderii în organism a unor agenți patogeni. Pasteur a demonstrat că proprietățile de patogenitate și virulență ale microorganismelor se pot modifica *in vitro*. Astfel, din culturile de bacterii patogene și virulente derivă culturi cu virulență *atenuată*, care se pot utiliza ca *vaccinuri*.

BCU "ASTRA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Louis Pasteur (18220–1895).

Pasteur a pus astfel bazele unei activități practice de o importanță practică excepțională – *vaccinarea.* A fundamentat științific domeniul imunității antiinfecțioase domeniu nou al științelor biologice – *Imunologia*, născută ca o ramură a Microbiologiei, dar care ulterior s-a separat complet, ca un domeniu de sine stătător. Este întemeietorul primului *Institut de Microbiologie* din lume – Institutul Pasteur din Paris. În plan teoretic, Pasteur a rezolvat controversa *generației spontanee*, demonstrând cu argumente experimentale că microorganismele sunt forme de viață cu un grad înalt de organizare, ce nu pot lua naștere spontan din materia organică. Totdeauna microorganismele își au originea în alte celule, care contaminează materia organică. El evidențiază în sângele animalelor moarte de cărbune (antrax) așa numita „bacteridie cărbunoasă". Existau totuși voci care afirmau că prezența acestei bacterii (*B. anthracis*) este consecința, și nu cauza bolii, sau că nu este vorba de organism viu, ci reprezintă cheaguri de fibrină.

Robert Koch (1843–1910) a obținut o cultură de *Bacillus anthracis* în ser sangvin și astfel a demonstrat fenomenul de sporulare și germinare, susținând că infecția animalelor se produce prin ingerarea materialelor vegetale contaminate cu bacterii din sol.

Robert Koch în laboratorul său (1843–1910).

Pasteur a izolat bacteria cărbunoasă de la animalele bolnave și din solul în care fuseseră îngropate cadavrele și a confirmat rezultatele lui Koch, demonstrând implicarea anelidelor în vehicularea și răspândirea sporilor; tot el a demonstrat și rolul bacililor anaerobi în etiologia gangrenei gazoase și prezența cocilor în furuncule și abcese, producând și primele vaccinuri, punând astfel bazele științifice ale vaccinării.

R. Koch a formulat *postulatele* pe baza cărora un microorganism izolat din organismul bolnav infectat este considerat agent patologic al bolii respective:

- microorganismul să fie evidențiat în toate cazurile, iar regăsirea lui în organism să corespundă leziunilor caracteristice bolii;
- microorganismul să poată fi izolat în cultură, pe mediu artificial;
- microorganismul să poată reproduce boala și manifestările leziunilor specifice pe animale sensibile de laborator.

Există o serie de excepții de la postulatele lui Koch (care au fost reformulate de către Evans), cum ar fi: bacteriile (*Treponema pallidum*, *Mycobacterium leprae*) și virusurile necultivabile sau pentru care nu au fost identificate gazde sensibile (virusul Epstein-Barr, HBV); agenții bolilor infecțioase cu perioadă de incubație foarte lungă (boli prionice, neoplazii); agenții bolilor infecțioase care necesită intervenția unor mecanisme dependente de gazdă pentru apariția procesului infecțios și care, în consecință, nu pot fi reproduse pe animale de laborator, boli cu etiologie plurifactorială și boli infecțioase, necontagioase și cu incidență mică în populație.

Pentru a încorpora toate aceste excepții, Evans a emis varianta moleculară a postulatelor lui Koch, și anume, un agent infecțios este considerat agentul etiologic al unei boli dacă:

- posedă în genom genele de virulență necesare pentru producerea procesului infecțios;
- îndepărtarea sau inactivarea genei de virulență duce la scăderea virulenței, iar introducerea genei într-o tulpină nevirulentă conduce la manifestarea virulenței;
- produsul genei de virulență induce sinteza anticorpilor protectori sau apariția imunității celulare.

Evoluția microbiologiei a fost impulsionată în sec. 19 și 20 de descoperirea și perfecționarea metodelor de examinare microscopică a microorganismelor și de cultivare pe medii artificiale.

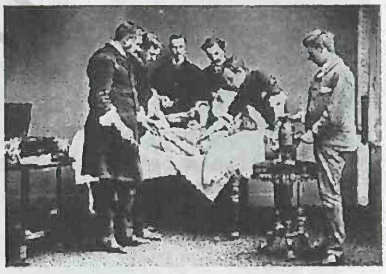
Carl Zeiss și Ernst Karl Abbe au construit microscopul cu imersie și lentilele apocromatice.

În 1835, Agostino Bassi di Lodi descoperă o specie fungică care cauzează o boală la viermii de mătase.

Ernst Abbe (1840–1905) Carl Zeiss (1816–1898) Otto Schott (1851–1935) Agostino Bassi di Lodi.
Portretul celor doi cercetători şi respectiv, al tehnicianului care au dezvoltat microscopul cu imersie.

În 1847, Ignaz Semmelweiss emite ipoteza conform căreia, în spitalele din vremea sa, medicii vehiculau agentul bolii în mediul spitalicesc, contaminând nou-născuţii şi mamele în timpul naşterii şi recomandă spălarea obligatorie a mâinilor înainte de atingerea pacienţilor.

Joseph Lister a introdus în 1867 principiul antisepsiei în chirurgie şi a utilizat mediile solide şi lichide, pentru cultivarea microorganismelor.

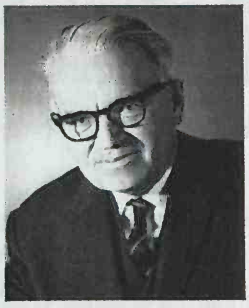


Ignaz Semmelweiss. Scenă de tablou de epocă reprezentând o sală de operaţii şi medici spălându-se pe mâini înainte de a examina gravidele sau mamele.

Joseph Lister (1827–1912).

Lister în laboratorul în care apare rezervorul cu spray carbolic pe care l-a inventat în 1869.

În 1892, Dimitri Ivanovski a descoperit virusul mozaicului tutunului (VMT), iar în 1899 Martinus Beijerinck a demonstrat dependenţa multiplicării virale de celula gazdă. El a intuit natura particulară a agentului mozaicului tutunului şi l-a considerat ca fiind "*contagium, vivum, fluidum*" (agent contagios, viu-corpuscular-filtrabil). Iniţial, *Virologia* s-a dezvoltat ca o ramură a Microbiologiei, dar raportându-ne la natura particulară a virusurilor, Virologia a devenit o ştiinţă independentă.



Ernst Ruska.

Primul microscop electronic păstrat la muzeul tehnic din Munchen.

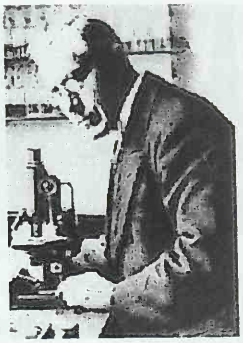
În 1900, Walter Reed a identificat vectorul biologic pentru agentul febrei galbene, iar Ernst August Friedrich Ruska a realizat primul microscop electronic. În România, Virologia a fost întemeiată şi dezvoltată de S. Nicolau, M. Ciucă, Constantin Levaditi.

În 1909, Paul Ehrlich, împreună cu asistentul său, Sahachiro Hata, au realizat primul tratament eficient contra sifilisului, pe bază de arsenic, numit *Salvarsan*. În 1928, Alexander Fleming a descoperit penicilina. În căutarea unor compuşi cu potenţial antibacterian, Fleming a observat inhibiţia creşterii coloniilor de *Staphylococcus aureus* în vecinătatea coloniilor fungice de *Penicillium notatum*. Apoi a arătat că mediul lichid al culturii de *P. notatum*, diluat de 800 de ori, a inhibat creşterea culturii de *S. aureus*, descoperind astfel „medicamentul miracol" – pentru care a fost distins cu premiul Nobel.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

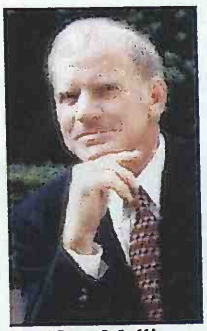
Dimitri Ivanovski.

Aspectul leziunilor produse de VMT pe frunzele de tutun.



Martinus Willem Beijerinck.

Maiorul Walter Reed.



Kary Mullis (n. 1944).

În 1977, W. Gilbert şi F. Sanger au introdus tehnologia secvenţierii ADN.

În 1982, Stanley B. Prusiner a introdus conceptul de *prion*, prin care defineşte o formă de infecţie nedescrisă anterior şi cauzată de anomalii ale structurii proteinelor.

În 1983, Kary Mullis a definit şi a dezvoltat reacţia PCR (*Polymerase Chain Reaction*), iar în 1995 a fost secvenţiat primul genom bacterian (*H. influenzae*).

În România, întemeierea Microbiologiei ca ştiinţă este legată de numele a două personalităţi de excepţie, Victor Babeş şi Ioan C. Catacuzino. Victor Babeş a fost colaboratorul lui Robert Koch, a studiat turbarea şi lepra, a descoperit granulaţiile de volutină, corpusculii Babeş-Ernst, cu aspect de halou (incluzii metacromatice din citoplasma bacteriilor Gram pozitive, aşa cum este *C. diphteriae*) şi corpusculii Babeş-Negri, incluzii din celulele nervoase din creierul organismelor infectate cu rabie.

Paul Ehrlich (1854–1915) în laborator, împreună cu asistentul său, S. Tata.

Alexander Flemming (1881–1955).

F. Sanger (n. 1918).

Stanley Prusiner (n. 1942)

A demonstrat localizarea urogenitală a tuberculozei, considerată până în acel moment, exclusiv pulmonară, a folosit o metodă proprie pentru evidenţierea bacilului tuberculozei, a dovedit, în premieră mondială, rolul sistemului nervos în menţinerea echilibrului funcţional al nutriţiei celulelor şi ţesuturilor, aspect cu rol fundamental în imunitatea naturală, a studiat agentul holerei găinilor, al febrei galbene, vaccinei, erizipelului, a descris agentul cauzal al morvei la om şi pneumococul. Încă din 1896–1891, V. Babeş a dovedit experimental existenţa anticorpilor în sângele animalelor imunizate şi puterea protectoare a acestora. În 1890, a sesizat posibilitatea transferului factorilor protectori de la mamă la făt, cu doi ani înainte ca Ehrlich să arate că anticorpii trec de la mamă la făt prin placentă.

Profesorul Victor Babeş. Fondatorul bacteriologiei în România (1854–1926).

A fost iniţiatorul terapiei anti-difterice, a descoperit genul *Babesia*, parazit din familia *Haemosporidae*, a colaborat cu André Cornil la lucrarea apărută la Paris, "*Les bactéries et leur rôle dans l'anatomie et l'histologie pathologiques des maladies infectieuses (Bacteriile şi rolul lor în anatomia şi histopatologia bolilor infecţioase)*" (1885), distinsă cu premiul Monthyon, acordat de Academia de Ştiinţe din Paris, într-o şedinţă prezidată chiar de Louis Pasteur.

În 1883, Victor Babeş este primit de către Pasteur în laboratorul său. În 1884, Babeş a descris fenomenul de *antibioză* (proprietatea unor bacterii de a elabora anumite substanţe cu efect inhibitor asupra dezvoltării altui microorganism), fenomen care, o jumătate de secol mai târziu, va sta la baza antibioterapiei.

În 1887, Victor Babeş fondează primul Institut de Cercetări Medicale din Bucureşti (cu un an înainte de înfiinţarea Institutului Pasteur din Paris în anul 1888), pe baza unei liste de subscriere publică internaţională, pentru *crearea unui institut de seruri şi vaccinuri care să fie pus sub conducerea lui Pasteur şi care să poarte numele acestuia*, pentru cercetări în domeniul anatomiei patologice şi bacteriologiei, institut care poartă astăzi numele lui Victor Babeş.

Ioan Cantacuzino a fost colaboratorul lui Metchnikoff în laboratorul lui Louis Pasteur, a studiat patogeneza tuberculozei, holerei, scarlatinei, morvei, leprei, febrei tifoidice şi paratifoidice, spirochetozelor. A preparat vaccinurile tifoparatific, variolic, cărbunos, BCG (România fiind a doua ţară din lume care a introdus vaccinarea). A elaborat prima lege sanitară din România.

La iniţiativa profesorului Ioan Cantacuzino, prin legea din 4 Aprilie 1921, se înfiinţează Institutul de Seruri şi Vaccinuri Dr. I. Cantacuzino din Bucureşti. Institutul este organizat şi condus după modelul Institutului Pasteur din Paris, având drept scop urmărirea evoluţiei tuturor bolilor infecto-contagioase şi asigurarea terapiei specifice prin prepararea serurilor şi vaccinurilor necesare în scopuri profilactice şi curative.

Cunoscător al metodelor de combatere a epizootiilor, a avut un rol decisiv în dezvoltarea învăţământului medical veterinar în România, înfiinţând în 1910 primul Institut de Stat pentru Prepararea de Seruri şi Vaccinuri de uz veterinar şi Institutul Vaccinogen pentru prepararea vaccinului Jennerian.

Profesorul Ioan Cantacuzino, creatorul Şcolii de microbiologie în România (1863–1934).

Bibliografie

Israil A. 2009. Personalităţi ale Institutului Cantacuzino. Editura Asclepios
http://www.cais-soas.com/CAIS/
http://www.cesil.com/cesil99/1maln1.jpg
http://load.azzona.az/
biology.clc.uc.edu/
http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Zacharias.jpg/250px-Zacharias.jpg
http://proto57.files.wordpress.com/2009/08/janssen_microscope.jpg
http://redes-cepalcala.org/olivaryescuela/divulgacion/3_Feria_Sevilla/Proyecto/RobertHooke.jpg www.leeds.ac.uk/.../adopt-a-book/pics/hooke.jpg,
http://www.ucmp.berkeley.edu/history/hooke.html
http://i.ehow.com/
http://vietsciences.free.fr/biographie/biologists/images/leeuwenhoek-micro.jpg
www.euronet.nl/users/warnar/leeuwenhoek.html
http://www.2blowhards.com/archives/Portrait%20of%20Louis%20Pasteur.jpg
http://www.emaramures.ro/UserFiles/Image/Foto%20Istoria%20zilei/Martie/24_03_robert-koch.jpg
http://www.amuseum.de/MikSchaffhaus/Folie28.JPG
www.dmipfmv.ulg.ac.be/bacvet/
http://random1881.files.wordpress.com/2008/12/ignaz-semmelweis.jpg
www.seed.slb.com/content.aspx?id=30290
web.ukonline.co.uk/b.gardner/Lister.html
http://web.ukonline.co.uk/b.gardner/listlab.gif
e-ciencia.com/.../Martinus_Beijerinck
http://www.zone10.com/images/mosaic-virus.jpg
http://www.knowledgerush.com/wiki_image/4/4e/WalterReed.jpeg
http://www.cap.ca/pic/Archives/55.4(1999)/herzberg.gif
Ernst Ruska Electron Microscope - Deutsches Museum - Munich-edit.jpg
http://www.marvistavet.net/assets/images/Alexander_Fleming.gif
http://www.todayinsci.com/S/Sanger_Frederick/SangerFrederickThm.jpg
http://www.aqtc.edu.cn/jxwz/wuhua/wlhx/jieshao/2j/Nobel%20Prize%20for%20Chemistry/chemistry-1980-3.gif
http://3.bp.blogspot.com/_DZH2cmCoois/SO0DjCunYAI/AAAAAAAAGD0/hFud7X5dHfk/s400/Nobel_Laureates_1997_Pusiner.jpg
http://arjunpuri.files.wordpress.com/2009/10/5-kary-mullis.jpg.

2. STRUCTURA ŞI FUNCŢIILE CELULEI BACTERIENE

Cunoaşterea structurii interne a celulei bacteriene este rezultatul utilizării tehnicilor de citochimie şi de microscopie electronică.

Structura reper a celulei bacteriene este *peretele celular*. În raport cu peretele se disting structurile *intraparietale* (care alcătuiesc protoplastul bacterian) şi structurile *extraparietale*.

Structurile intraparietale sunt:

- spaţiul periplasmic;
- membrana plasmatică;
- mezosomul;
- citoplasma;
- ribosomii;
- incluziile;
- vacuolele;
- sporul;
- aparatul fotosintetic;
- rhapidosomii (*rhapidos* = baston) – incluzii ribonucleoproteice în formă de baston;
- magnetosomii – incluzii intracelulare cu structură cristalină delimitate de membrană, formate din magnetită (Fe_3O_4). Magnetosomii conferă dipol magnetic permanent celulei, permiţându-i să se alinieze pasiv la câmpul geomagnetic. Bacteriile care produc magnetosomi manifestă *magnetotaxie*, adică procesul de orientare şi migrare de-a lungul liniilor câmpului magnetic.

Structurile extraparietale sunt reprezentate de:

- glicocalix cu variantele sale structurale: capsula şi glicocalixul comportamental;
- flageli;
- fimbrii şi pili;
- spini – structuri pericelulare groase la bază şi ascuţite la vârf.

Unele structuri (membrana, citoplasma, nucleoidul, ribosomii) sunt *esenţiale* (obligatorii) şi se găsesc la toate celulele bacteriene. Altele sunt *facultative* (spor, aparat fotosintetic, capsulă, flageli), fiind prezente numai la anumite grupe de bacterii.

2.1. Peretele celular

Peretele celular este o structură rigidă de înveliş, care înconjoară complet celula bacteriană. La cele mobile, peretele este străbătut de flageli. Structura parietală lipseşte la bacteriile din grupul *Mycoplasma*, precum şi la cele halofile extreme (cele care trăiesc în medii saline foarte concentrate, unde structura protectoare faţă de şocul osmotic nu este necesară). Un criteriu empiric cu o valoare practică deosebită în clasificarea şi identificarea procariotelor este comportamentul la colorația Gram (C. Gram, 1884). Caracterul Gram pozitiv sau Gram negativ reflectă deosebirile structurale majore ale celor două grupuri de bacterii. Colorația Gram implică tratamentul succesiv al celulelor cu cristal-violet (un colorant bazic), urmat de tratamentul cu soluţie de iod în KI şi ulterior, extracţia cu un solvent organic polar (alcool sau acetona). În celulă, cristal-violetul şi iodul formează un complex insolubil. Celulele care rezistă etapei decolorării şi reţin complexul insolubil (cristal violet-iod) violet închis sunt celule Gram pozitive, iar cele care nu reţin colorantul sunt Gram negative. Caracterul Gram pozitiv sau Gram negativ reflectă deosebiri structurale majore ale peretelui celular.

În funcție de particularitățile structurale ale peretelui, bacteriile se împart în 4 categorii:

1. *Firmacutes* (*firmus* = tare; *cutis* = înveliș) sunt bacteriile Gram pozitive, cu perete celular gros și rigid, la care mureina reprezintă până la 80% din greutatea uscată a acestei structuri și bacteriile acido-alcoolo-rezistente.

2. *Gracillicutes* (*gracillis* = subțire, fin) sunt bacteriile Gram negative cu perete subțire, la care mureina reprezintă circa 10% din greutatea uscată a peretelui.

3. *Mendosicutes* (*mendosus* =o structură cu defecte). Noțiunea desemnează organismele domeniului *Archaea*, care au perete celular din care lipsește mureina.

Marea majoritate a bacteriilor cunoscute aparțin grupului Gram pozitive sau Gram negative.

4. *Mollicutes* sau *Tenericutes* (*mollis, tener* = moale) cuprinde bacteriile din grupul *Mycoplasma*, lipsite de perete. Periferia celulei este acoperită de o membrană ce conține *steroli*, cu rol protector față de liza osmotică. Sunt cele mai mici bacterii cunoscute, cu capacitatea de a crește pe medii inerte.

2.1.1. Structura moleculară a peretelui la bacteriile Gram pozitive

La bacteriile Gram pozitive, peretele celular este gros, rezistent și rigid. Componenta esențială este *mureina,* denumită încă și *peptidoglican, glicopeptid, mucopeptid* sau *glucozaminopeptid.* Mureina formează un strat rigid, adiacent membranei plasmatice, iar sub aspectul compoziției chimice este unitară la toate eubacteriile (Gram pozitive și Gram negative).

Mureina este alcătuită dintr-o componentă peptidică și una glucidică. Componenta glucidică repetitivă este un dizaharid format din *N-acetil-D-glucozamină* și *acid N-acetilmuramic*, legate β 1-4. Acidul *N-acetilmuramic* rezultă prin stabilirea unei legături esterice între N-acetil-D-glucozamină și acidul lactic (fig. 1). La fiecare unitate diglucidică este legată o componentă peptidică, reprezentată de un tetrapeptid, a cărui compoziție în aminoacizi este variabilă în funcție de specie, dar conține *L-alanină, acid D-glutamic, acid diaminopimelic* (derivat al lizinei) sau lizina și *D-alanina* și se leagă de acidul N-acetilmuramic (fig. 1, 2). *Acidul N-acetil muramic și D-aminoacizii sunt markeri biochimici ai eubacteriilor.*

Legăturile glicozidice nu sunt suficiente pentru a asigura rigiditatea structurii parietale. Tetrapeptidele sunt legate prin punți peptidice transversale (fig. 3). La bacteriile Gram negative, punțile peptidice transversale reunesc gruparea NH_2 a acidului diaminopimelic, cu gruparea COOH a D-Ala terminale a peptidului adiacent.

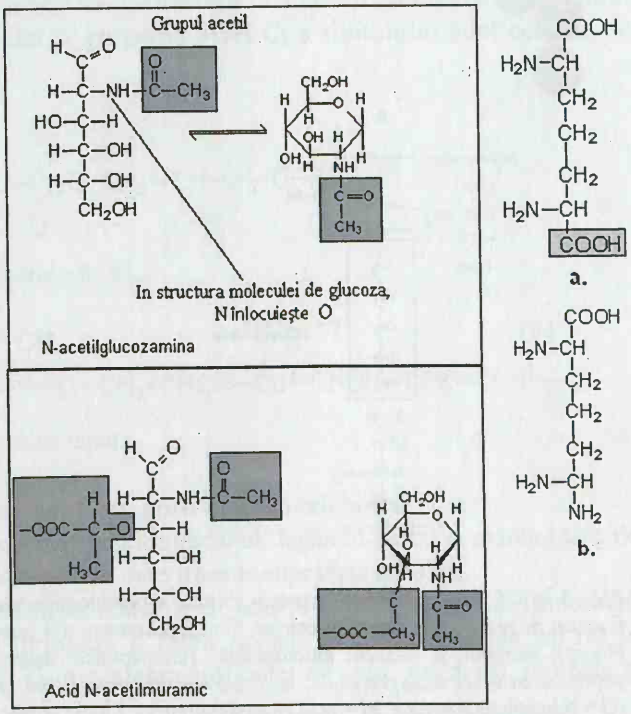


Fig. 1. Derivații glucidici cei mai comuni în structura peretelui celular bacterian: N-acetil-glucozamina și acidul N-acetilmuramic. a. Acidul diaminopimelic, derivat al lizinei. b. Lizina.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

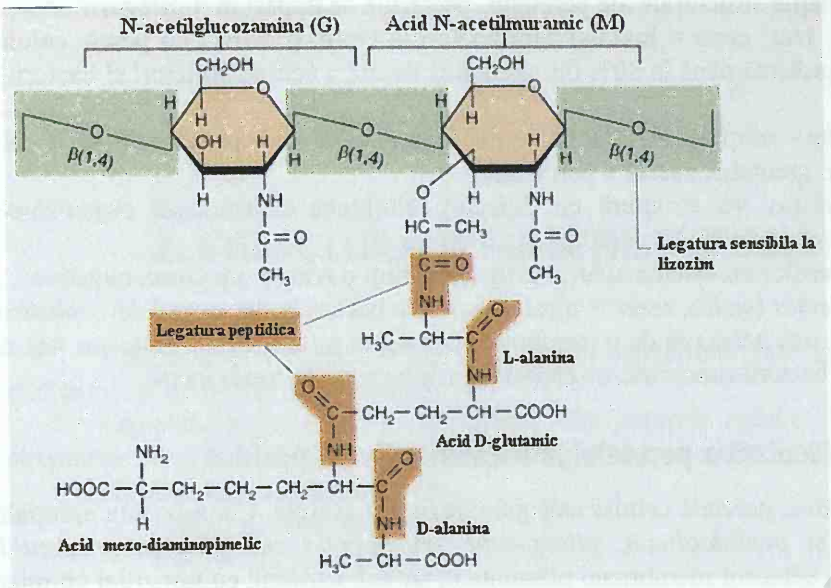


Fig. 2. Structura glicanului tetrapeptidic, una dintre unitățile repetitive ale peptidoglicanului structurilor parietale. Această structură chimică se găsește la *E. coli*, dar bacteriile conțin și alți aminoacizi.

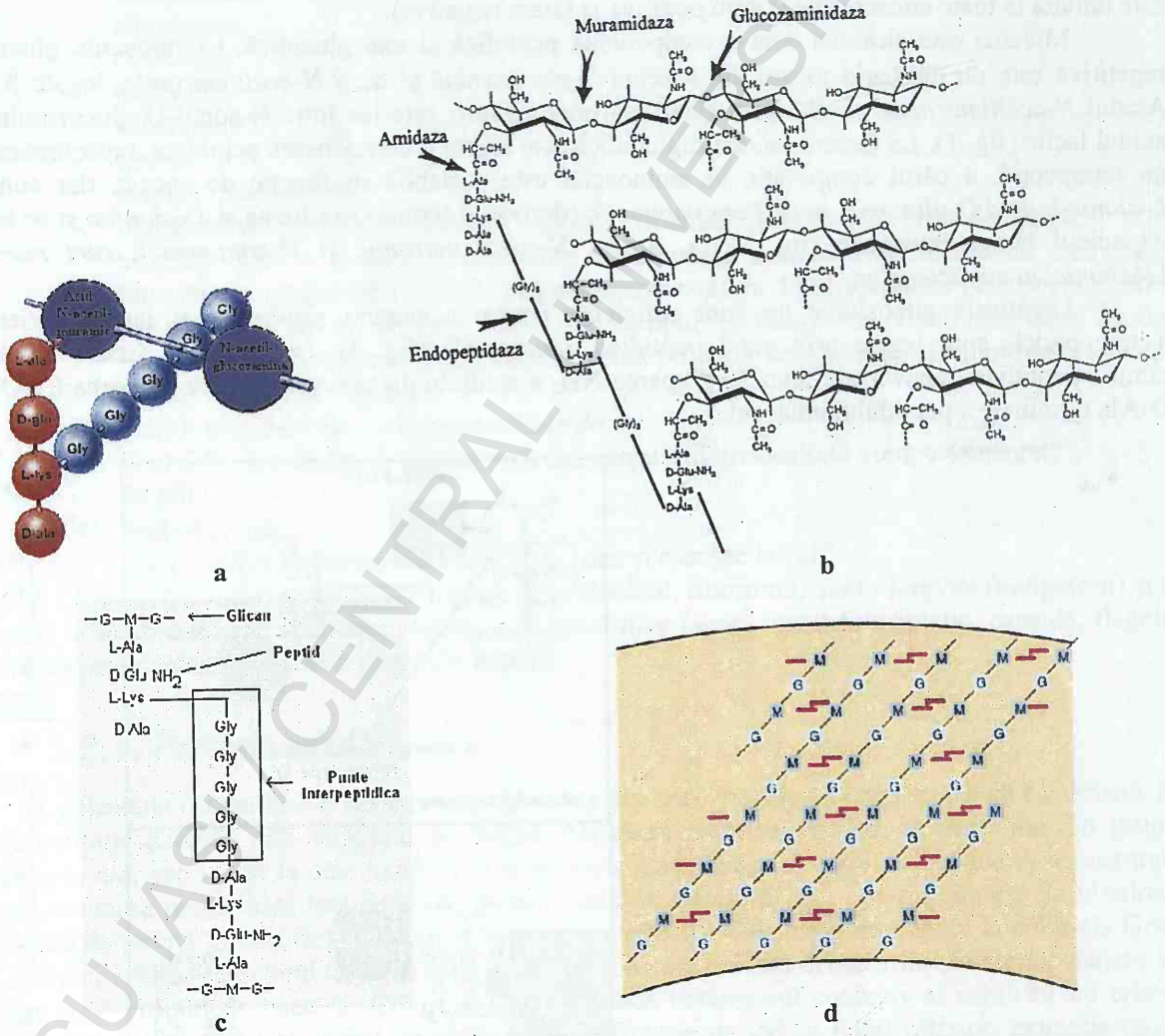


Fig. 3. (a) Modelul general al structurii chimice a peptidoglicanului. (b) Săgețile indică situsurile la care peptidoglicanul poate fi atacat de hidrolazele peretelui celular. Sunt reprezentate trei catene de peptidoglican ce constau din resturi alternante de acid N-acetil muramic și N-acetil glucozamină. Tetrapeptidele legate de acidul N-acetilmuramic sunt interconectate prin punți peptidice cu o secvență variabilă, la *S. aureus* de *pentaglicină* (c), (d) Reprezentarea structurii generale a peptidoglicanului (G = N-acetilglucozamina; M = acid N-acetilmuramic). Liniile groase reprezintă legături peptidice transversale (după Brock, 1988).

CU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu cât numărul de legături peptidice este mai mare, cu atât creşte rigiditatea peretelui. Se formează astfel o structură covalentă perfect continuă în jurul celulei, o moleculă mureinică gigantă, un adevărat *sac mureinic*, cu structură tridimensională dinamică.

Peptidoglicanii diferitelor specii diferă prin aminoacizii 2 şi 3 ai tetrapeptidului şi prin frecvenţa punţilor transversale de pentaglicină. Speciile patogene au o frecvenţă superioară a punţilor transversale, ceea ce se corelează cu o rezistenţă mai mare a mureinei la acţiunea factorilor litici din umorile organismului (lizozimul etc.).

Sinteza peptidoglicanului începe cu sinteza în citoplasmă a complexului *UDP-acid N-acetilmuramic-pentapeptid,* ataşat de bactoprenol (un lipid al membranei), cuplat ulterior cu o moleculă de N-acetilglucozamină de la UDP. Dizaharidul este polimerizat la un intermediar oligozaharidic şi este transferat la capătul în curs de sinteză al polimerului glicolipidic parietal.

Legarea transversală este rezultatul unei reacţii de *transpeptidare*, în care grupul $-NH_2$ al unui rest de pentaglicină înlocuieşte D-Ala terminală a peptidului învecinat. Reacţia de transpeptidare este catalizată de PBP (*penicillin binding proteins*). PBP leagă covalent penicilina şi alte antibiotice β-lactamice, datorită asemănării structurale parţiale dintre antibiotic şi precursorul pentapeptidic.

Calea biosintetică oferă explicaţia acţiunii selective a unor agenţi antibacterieni (lizozimul şi penicilina) asupra peretelui mureinic.

Lizozimul clivează legăturile glicozidice β 1-4 şi hidrolizează mureina celulelor aflate în *faza staţionară*.

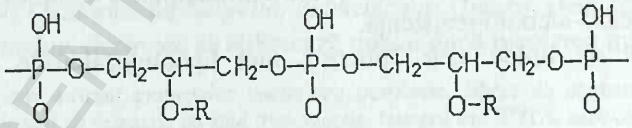
Penicilina inhibă celulele bacteriene aflate în *faza de creştere*, deoarece inhibă treapta finală a sintezei mureinei, reacţia de *transpeptidare*, adică formarea legăturilor peptidice transversale între catenele de glican adiacente. Inhibiţia transpeptidării sub acţiunea penicilinei duce la formarea unui peptidoglican subţire, urmat de liza şi moartea celulei, pentru că autolizinele continuă să funcţioneze, iar alte punţi peptidice nu se mai formează. De aceea, penicilina este activă numai asupra celulelor care cresc. În celulele care nu cresc, autolizinele nu sunt active şi peptidoglicanul nu este degradat.

Orice compus chimic care interferă cu sinteza peptidoglicanului are ca rezultat sinteza unui perete discontinuu sau mai subţire şi liza celulei.

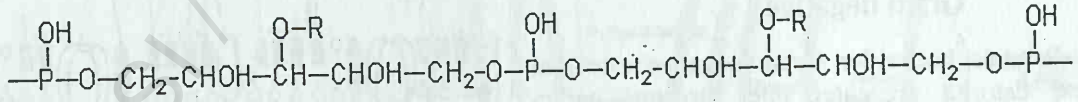
La nivelul peretelui mureinic sunt localizate enzimele care modelează creşterea sa: *murein-hidrolazele* taie legăturile chimice ale mureinei, iar *murein-sintetazele* inseră noi unităţi de construcţie.

Mureina formează o matrice, în care se găsesc alţi polimeri: polizaharide, acizi teichoici.

Acizii teichoici sunt molecule lungi şi flexibile. Din punct de vedere chimic sunt polimeri de l-3-*poliglicerol-fosfat* sau de *poli-ribitol-fosfat*, legaţi fosfo-diesteric. Polimerii formează axul central al moleculei. Grupările –OH libere ale glicerolului şi gruparea –OH C_3 a ribitolului sunt ocupate de resturi de D-Ala, D-Glc sau de N-AcGlc.



Poliglicerol – fosfat.



Poliribitol fosfat.

La bacteriile Gram pozitive sunt prezente două categorii de acizi teichoici:

- *acizi lipoteichoici* (ALT), care traversează peptidoglicanul, legându-se cu o extremi-tate de glicolipidele din membrană, iar celălalt capăt este liber la suprafaţa celulei;
- *acizi teichoici parietali*, ataşaţi covalent de resturile de acid N-acetilmuramic ale mureinei.

Împreună cu mureina, acizii teichoici formează o reţea polianionică sau matrice, cu rol în menţinerea echilibrului cu cationii metalici, dar şi în reglarea traficului de ioni, nutrienţi, proteine şi antibiotice.

BCU IAŞI / CENTRUL NAŢIONAL DE CARTE

Funcţiile acizilor teichoici sunt multiple:

- acizii teichoici sunt structuri moleculare filamentoase, care conferă un plus de rigiditate peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive;
- fiind polianionici, au rol în transportul cationilor metalici în/şi din celulă;
- au rolul de receptori de fagi;
- au rolul de *adezine* (mediază aderenţa celulei la substrat, favorizând formarea biofilmelor), conferă rezistenţă la antibiotice. La bacteriile patogene, acizii teichoici sunt un factor de virulenţă, deoarece au proprietăţi chimiotactic negative faţă de fagocite. Acizii teichoici parietali sunt imunogeni, atât în stare liberă, cât şi asociaţi celulei.

Uneori bacteriile secretă cantităţi mari de acizi teichoici solubili.

Bacteriile Gram pozitive care nu au acizi teichoici prezintă molecule anionice cu funcţii asemănătoare (de exemplu, lipomananul, în locul ALT la *Micrococcus luteus*).

2.1.2. Peretele celular acido-alcoolo- rezistent al micobacteriilor

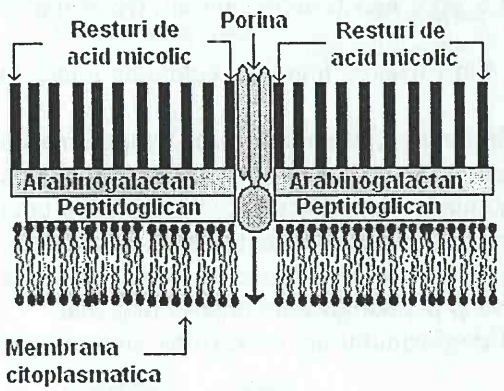


Fig. 4. Reprezentarea schematică a componentelor peretelui celular acido-rezistent la grupul *Mycobacterium – Nocardia.* Regiunea externă a învelişului conţine unităţi lungi de acid micolic legat de arabinogalactan (după Holt, 1998).

Unele bacterii (*Mycobacterium tuberculosis, Corynebacterium diphteriae, Nocardia asteroides)* au perete celular cu o structură chimică particulară (fig. 4). În compoziţia sa intră lipide complexe, care nu se găsesc în structura parietală a altor bacterii. Celulele bacteriene se colorează slab după protocolul coloraţiei Gram, dar se colorează la cald cu fuxină bazică concentrată şi sunt rezistente la decolorare succesivă cu acid sulfuric diluat şi alcool etilic 96%. Aceste organisme se numesc *acido-alcoolo-rezistente.*

Rezistenţa la decolorare se datorează compoziţiei chimice a peretelui celular. Peptidoglicanul micobacteriilor conţine acid diaminopimelic ca acid diaminic major, iar acidul muramic este N-glicozilat (şi nu N-acetilat).

Un alt compus major parietal al micobacteriilor este polizaharidul cu greutate moleculară mare – *arabinogalactanul,* un copolimer polizaharidic, alcătuit din *arabinoză* şi *galactoză*, esterificate cu acizi graşi cu catenă lungă – *acizii micolici* – cu 70–90 atomi de C. La *Corynebacterium* şi *Nocardia*, acizii graşi au catenă mai scurtă (40–60 de atomi de C). Glicolipidele complexe din structura peretelui conferă proprietatea de acido-alcoolo-rezistenţă.

A II-a categorie de lipide, cele "libere", sunt lipooligozaharide ce conţin trehaloza şi lipoarabinomanani.

2.1.3. Peretele celular la bacteriile Gram negative

Peretele bacteriilor Gram negative este mai complex, datorită prezenţei unei structuri caracteristice denumită *membrana externă,* o replică structurală a membranei plasmatice, care poate fi astfel considerată ca *membrană internă* (fig. 5). Membrana externă, ca şi celelalte membrane biologice, este alcătuită dintr-un strat lipidic dublu, puţin permeabil pentru moleculele hidrofile. În stratul lipidic sunt inclavate proteine, denumite *porine*, ce formează canale pentru influxul nutrienţilor şi pentru eliminarea produselor de catabolism.

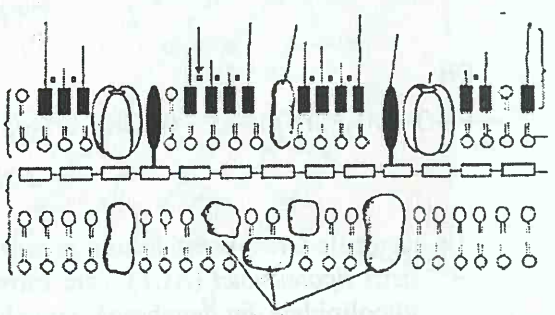


Fig. 5. Reprezentarea schematică a structurii moleculare a peretelui celular la bacteriile Gram negative. Proteinele trimere matriceale din membrana externă sunt asociate cu lipoproteine şi cu lipopolizaharide (LPS). LPS sunt legate covalent de peptidoglican.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Porinele s-au găsit la toate bacteriile Gram negative şi chiar la un grup de bacterii Gram pozitive: *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium*, care produc un perete celular bogat în lipide, asemănător dublului strat.

Analiza filogeniei organismelor procariote pe baza secvenţierii proteinelor a dus la concluzia existenţei unor diferenţe filogenetice majore între organismele cu înveliş dublu membranar (''didermice'') şi cele cu membrană simplă (''monodermice'').

La microscopul electronic, membrana externă a peretelui apare pluristratificată. Componentele chimice sunt fosfolipide (35% din greutatea uscată), proteine (15%) şi lipopolizaharide (50%).

Proteinele membranei externe se numesc *porine*, deoarece reglează permeabilitatea şi constituie canalele membranare de transport celular. Iniţial s-au descris trei tipuri de porine: OmpF, OmpC şi PhoE. Analiza prin metoda cristalografiei cu raze X relevă că porinele sunt *proteine transmembranare* trimerice cu o secvenţă de 250–450 aminoacizi, a căror configuraţie secundară este cea de β-pliere. Aproape invariabil, secvenţele porinelor au la capătul C-terminal *fenil-alanina*, sau rareori *triptofanul*. Porinele au funcţie de canale de difuzie a moleculelor mici. Unele porine sunt permeabile pentru orice moleculă mai mică de 600 Da, altele sunt bariere selective de permeabilitate pentru anioni sau cationi, sau favorizează trecerea moleculelor polare* în raport cu cele nepolare. O celulă de *E. coli* produce circa 10^5 molecule porine. În mediul hiperosmotic, numărul porinelor diminuează.

* Grupările *polare* conţin atomi de O, S sau N, ce acţionează ca acceptori de legături de H prin intermediul cărora interacţionează cu alte grupări de semn opus sau cu apa ca solvent.

O moleculă sau un grup de atomi este *nepolar*, dacă îi lipsesc atomii electronegativi – N, O, S, astfel că nu conţine grupări cu sarcini electrostatice importante: steroizii şi alte lipide, lanţurile lungi hidrocarbonate ale aminoacizilor Leu, Ileu, Val.

Cel puţin la enterobacterii, dublul strat fosfolipidic al membranei externe este asimetric:

- stratul extern conţine aproape exclusiv LPS;
- stratul intern conţine aproape exclusiv fosfolipide.

Lipoproteinele leagă ferm membrana externă de peptidoglicanul profund (Magnuson şi colab., 1993).

La bacteriile Gram negative, mureina reprezintă numai 2,5–10% din greutatea uscată a peretelui.

Mureina este localizată în stratul cel mai intern al peretelui. După un tratament adecvat, membrana externă se poate îndepărta şi se obţine sacul mureinic pur, extrem de fin, care păstrează forma originală a celulei şi care sugerează că mureina ar putea fi o reţea bidimensională (un monostrat molecular), în timp ce la bacteriile Gram pozitive cantitatea de peptidoglican corespunde la minimum 20 de straturi moleculare.

Lipopolizaharidele (LPS) sunt inclavate în membrana externă. Ele sunt de fapt *endotoxinele*** bacteriilor Gram negative (*Salmonella, Shigella, Escherichia)* (fig. 6). Deşi sunt localizate la suprafaţa celulei, se numesc *endotoxine*, deoarece se eliberează numai după pierderea integrităţii celulei.

** Termenul LPS este atribuit extractelor bacteriene purificate, libere de contaminanţi detectabili, în special proteine. Endotoxina este produsul de extracţie cu acid tricloracetic, butanol sau EDTA, care constă din macromolecule LPS, proteine şi fosfolipide.

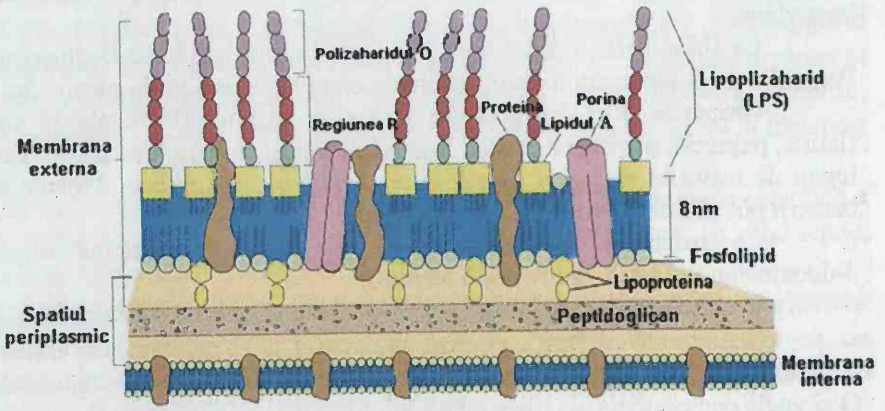


Fig. 6. Raporturile macromoleculelor componente ale peretelui celular (după Todar, 2004).

BCU IASI / CITIRE - UNIVERSITY LIBRARY

2.1.3.1. Structura chimică a moleculei de LPS

Din punct de vedere chimic, LPS sunt molecule complexe, fiind alcătuite dintr-o fracție lipidică și una polizaharidică. De aici derivă proprietățile *amfipatice* ale acestui agregat molecular, conferit de grupări polare hidrofile și grupări apolare hidrofobe.

Datorită poziției lor externe, LPS se pot extrage din celule, cu fenol 45-60%.

La microscopul electronic, filamentele LPS au o structură trilaminară, corespunzătoare celor două straturi poliozidice și stratului lipidic.

Cele mai studiate LPS sunt cele produse de tulpinile de *Salmonella*. Din punct de vedere structural, molecula LPS are trei regiuni (Schnaitman și Klena, 1993) (fig. 7a):

- regiune *polizaharidică externă* (polizaharidul O)
- regiune *oligozaharidică intermediară* (regiunea R)
- regiune internă hidrofobă, denumită *lipidul A*, prin care LPS se ancorează în membrana externă, printre moleculele fosfolipidice.

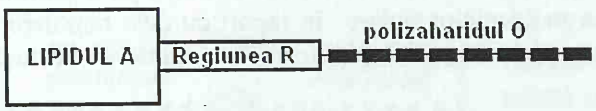


Fig. 7a. Reprezentarea schematică a structurii moleculei de LPS.

Regiunile intermediară și internă ale moleculei LPS au compoziție chimică relativ constantă la diferite specii de bacterii Gram negative.

Polizaharidul regiunii externe este un polimer de până la 100 de resturi glucidice, format din unități oligozaharidice repetitive, care conferă specificitate serologică de grup unor bacterii Gram negative (de exemplu, *Salmonella Shigella, Vibrio, E. coli*). Unitățile oligozaharidice conțin 2–4 glucide: D-manoza, D-galactoza, L-ramnoza, o dezoxihexoză, o didezoxihexoză. Didezoxihexozele sunt zaharuri care nu există în stare liberă în natură, dar intră frecvent în structura polizaharidului enterobacteriilor și au primit denumiri care derivă de la speciile de origine: abequoza, tiveloza, paratoza, colitoza.

Variația antigenică a polizaharidului regiunii externe se amplifică pe următoarele căi:

– schimbări ale poziției legăturilor (de exemplu, 1–4 în loc de 1–6);
– configurații* moleculare modificate;
– înlocuiri la nivelul diferitelor subunități repetitive;
– deleția sau substituția unui rest glucidic din subunitățile oligozaharidice.

* *Configurația* moleculei se referă la raportul geometric între un set de atomi (de exemplu, cei care deosebesc acizii L de acizii D). Conversia între variantele configurației necesită ruperea legăturilor covalente. *Conformația* se referă la raportul spațial al atomilor în moleculă. Conversia între variantele conformaționale se face fără ruperea legăturilor covalente.

Regiunea centrală a LPS ("miezul" R) este formată dintr-un oligozaharid de până la 15 resturi, legat covalent la poziția 3 a lipidului A printr-un trizaharid, 2-ceto-3-dezoxioctonat (KDO). Are o variabilitate chimică mult mai restrânsă și conferă specificitate de gen.

Lipidul A este legat covalent de oligozaharidul regiunii centrale R, fiind inserat și ancorat, prin catenele acizilor grași, cu lipidele membranei externe. Întreaga moleculă LPS este astfel orientată, încât polizaharidul O se proiectează la exterior și determină specificitatea antigenică a celulei bacteriene.

La *Salmonella*, lipidul A este alcătuit din dizaharide de D-glucozamină, legate β 1'–6 (fig. 7b). Perechile de D-glucozamină sunt interconectate 1–4', prin punți pirofosfat.

Grupările –OH din pozițiile 3, 4 și 6' ale fiecărui dizaharid sunt substituite de acizi grași (lauric, palmitic, miristoximiristic, hidroximiristic), cu lungimea medie a catenei de 10–28 atomi de C, legați de resturile de zahăr prin legături esterice sau amidice. Moleculele lipidice A ale diferitelor bacterii pot să difere prin resturile glucidice.

La grupul –OH din poziția 3 se leagă componenta oligozaharidică (acidul 2-ceto, 3-deoxioctanoic) (KDO) a regiunii centrale.

Grupările $-NH_2$ ale glucozaminei sunt substituite de acidul D-3-hidroximiristic.

Componenta lipidică conferă moleculei LPS calitatea de toxină. Lipidul A are proprietăți endotoxice, evidențiate la mutantele R care sintetizează LPS incomplet, căruia îi lipsește polizaharidul O și unele componente ale oligozaharidului regiunii intermediare R.

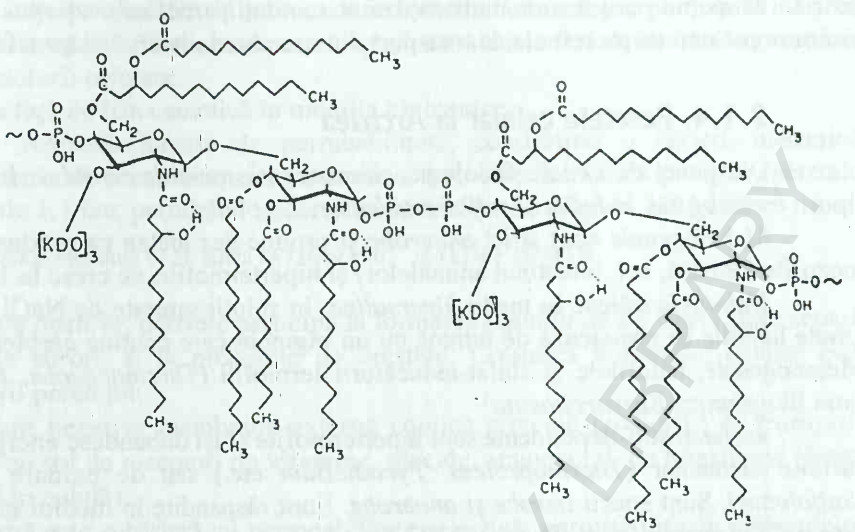


Fig. 7b. Structura lipidului A al LPS de *Salmonella*, cu trizaharidul KDO (keto-deoxi-octanoic) şi cu resturile de acizi graşi.

În mediile naturale, cele mai multe bacterii sintetizează polizaharidul O şi formează colonii *S.* Cele care nu sintetizează polizaharidul O formează colonii *R.* Polizaharidul O nu este factorul determinant al patogenităţii, deoarece formele coloniale *R* ale *B. pertusis, N gonnorhoeae* sunt patogene.

Moleculele de LPS formează baza structurală a membranei externe.

LPS este *polianionică* datorită sarcinilor negative ale lipidului A şi leagă cationi. Moleculele adiacente polianionice de LPS sunt aparent legate electrostatic, una de alta, prin cationi bivalenţi (Ca^{2+}, Mg^{2+}) şi formează o structură compactă ca un "acoperiş de ţiglă", pe suprafaţa membranei externe. Situsurile LPS care leagă cationii sunt esenţiale pentru integritatea membranei externe, dar în acelaşi timp ele reprezintă "călcâiul lui Ahile" al acestei structuri, deoarece antibioticele *policationice* din grupul *polimixinei* se complexează avid cu LPS şi dezorganizează membrana externă, mărind permeabilitatea pentru agenţii cu acţiune asupra membranei sau componentelor citoplasmatice. Toţi agenţii policationici se leagă de LPS anionice, cu o afinitate variabilă. Bacteriile Gram negative sunt rezistente la detergenţii anionici şi neutri, dar sunt sensibile la detergenţii monocationici.

Agenţii chelatori ai ionilor de Ca^{2+} şi Mg^{2+} dezorganizează şi permeabilizează membrana externă (Vaara, 1992).

Reacţia la coloraţia Gram nu se corelează strict cu compoziţia chimică a peretelui, ci depinde de structura sa fizică, de starea fiziologică a celulei, de integritatea ei structurală. Astfel, levurile, deşi au perete celular gros, dar cu o compoziţie chimică diferită de a mureinei, se colorează Gram pozitiv, iar bacteriile Gram pozitive îmbătrânite se colorează Gram negativ.

2.1.3.2. Spaţiul periplasmic

Spaţiul periplasmic este un compartiment celular al bacteriilor Gram negative, delimitat de membrana externă a peretelui celular şi de membrana internă (citoplasmatică). Este singurul compartiment al celulei procariote şi conţine un volum apos semnificativ în care se găsesc proteine şi oligozaharide. Proteinele sunt reprezentate de enzime *degradative* (DN-aza, RN-aza, proteaze, fosfataze, penicilinaza etc.) şi proteine de *legare* specifice pentru diferite molecule, cu rol în transport şi chimiotaxie.

Oligozaharidele se găsesc în concentraţii variabile şi au rolul de a regla presiunea osmotică a celulei. Când presiunea osmotică a mediului creşte, oligozaharidele trec în citoplasmă, iar când scade, oligozaharidele revin în spaţiul periplasmic.

Spaţiul periplasmic îndeplineşte o funcţie esenţială ce constă în acumularea nutrienţilor moleculari din mediu, înainte de a pătrunde în celulă. Spaţiul periplasmic funcţionează ca un compartiment adaptativ, a cărui funcţie de depozit este foarte importantă, deoarece bacteriile Gram negative trăiesc, de cele mai multe ori, în mediile oligotrofe (mediile aquatice).

BUCUR CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În spațiul periplasmic, nutrienții sunt scindați parțial sub acțiunea enzimelor degradative și de aici sunt preluați de proteinele de transport din membrana internă și transferați în celulă.

2.1.4. Peretele celular la *Archaea*

Din punct de vedere fiziologic, microorganismele *domeniului Archaea* sunt împărțite în trei tipuri: *metanogene, halofile și sulf-dependente.*

Metanogenele sunt strict *anaerobe* și produc gaz metan ca produs final al fermentației. Pot fi mezofile (din apă, sol, intestinul animalelor) și hipertermofile, ce cresc la 110° (*Methanopyrus).*

Halofilele trăiesc în medii *hipersaline,* în soluții saturate de NaCl (*Halobacterium halobium).* Unele halofile se protejează de lumină cu un pigment care conține carotenoizi. Sunt *aerobe obligate.* Metanogenele, halofilele și sulfat-reducătorii termofili (*Thermococcus, Pyrococcus)* sunt incluse în linia filogenetică *Euryarchaeota.*

Archaea sulf-dependente sunt hipertermofile și își dobândesc energia prin reacții de reducere a sulfului elementar (*Thermoproteus, Pyrodictium* etc.) sau de oxidare a compușilor reduși ai S (*Sulfolobus).* Sunt specii *aerobe și anaerobe.* Sunt răspândite în mediul marin și în mediile vulcanice terestre. Ele aparțin liniei filogenetice *Crenarchaeota (crenos* = izvor*).*

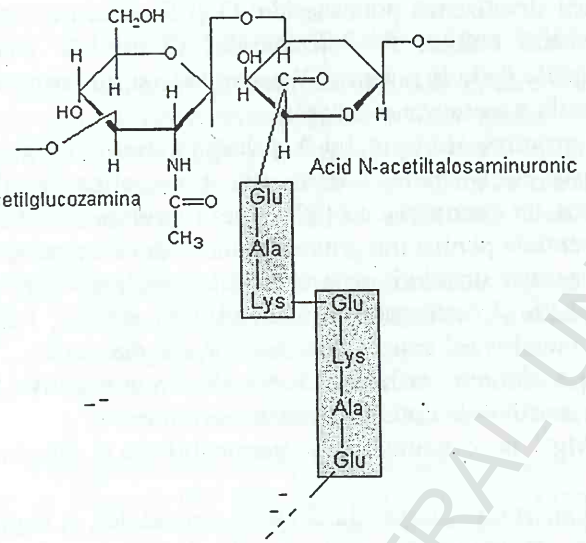


Fig. 8. Structura pseudomureinei, polimerul peretelui celular la *Methanobacterium sp.*

La *Archaea,* peretele celular prezintă diferențe structurale majore, comparativ cu al eubacteriilor (fig. 8). Diferitele specii de *Archaea* se colorează Gram pozitiv sau Gram negativ. Peretele lor nu conține acid muramic sau D-aminoacizi, markeri biochimici ai mureinei.

Din punct de vedere chimic, peretele la *Archaea* este heterogen. La *Archaea* Gram pozitive (*Methanobacterium* – producătoare de metan), peretele conține o *pseudomureină, metanocondroitină* sau *heteropolizaharide.*

Pseudomureina (markerul biochimic al metanobacteriilor) este alcătuită din unități repetitive formate din două zaharuri aminate (N-acetilglucozamină și acidul N-*acetiltalosaminuronic*, markerul biochimic al metanobacteriilor), legate β 1–3. Resturile acidului N-acetiltalosaminuronic sunt legate prin *punți peptidice* (ca și la mureină), iar aminoacizii sunt numai izomeri L. Legăturile β 1–3 ale pseudomureinei sunt rezistente la acțiunea lizozimului. Componenta peptidică este alcătuită din 3 L-aminoacizi: acid glutamic, alanina și lizina.

Ambele componente pot fi modificate: N-acetilglucozamina poate fi înlocuită total sau parțial de N-acetilgalactozamină, iar resturile de glicină, treonină, ornitină sau asparagină pot lua locul celor 3 aminoacizi, dacă sunt în concentrații mari în mediul de creștere.

Mureina și pseudomureina sunt componente omologe ca structură și funcție, dar diversitatea compoziției chimice exclude originea lor comună.

Archaea cu alte tipuri de înveliș celular reacționează Gram negativ, dar structura tipică de perete Gram negativ lipsește.

2.1.5. Funcțiile peretelui celular

Peretele celular este o structură esențială a celulei bacteriene, îndeplinind funcții multiple:

– este o structură cu rol esențial în *arhitectura celulară*, pentru că fiind rigid, determină forma celulei și menținerea ei. După pierderea conținutului celular, sacul mureinic

BOJAI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

păstrează forma inițială a celulei. Mureina conferă *elasticitate* celulei, permițând mărirea volumului ei prin creștere. Elasticitatea este capacitatea de a suferi deformări la presiune, fără alterarea structurii celulare.
- conferă protecția față de liza osmotică în mediile hipotonice;
- peretele celular reglează funcția de permeabilitate, constituind o barieră mecanică suplimentară, alături de membrana citoplasmatică. La bacteriile Gram pozitive, peretele are o porozitate de 1,1 nm, permițând trecerea moleculelor mai mici de 1200 Da*.

* Un dalton este egal cu masa atomului de H, adică $1{,}672649 \times 10^{-24}$ g. 1 kDa = 1 000 Da.

- la bacteriile *Gram pozitive*, peretele participă la formarea *septului de diviziune*, care separă cele două celule surori, și la procesele de creștere. Creșterea volumului celular este rezultatul creșterii peretelui;
- la bacteriile Gram negative membrana externă conține proteine cu funcții de *transport molecular*, care au rol de receptori de vitamine, glucide, aminoacizi, de transferine (leagă Fe și îl transferă în celulă);
- membrana externă este o barieră cu permeabilitate selectivă: permite difuzia moleculelor mici în ambele sensuri, fiind impermeabilă pentru macromolecule. Permite difuzia limitată a substanțelor hidrofobe, deoarece lama externă nu conține glicerofosfolipide. Suprafața celulei este acoperită cu LPS, care formează o structură quasicristalină. Din această cauză, lama externă nu prezintă o difuzie laterală marcată a moleculelor, tipică membranelor alcătuite din glicerofosfolipide;
- *porinele* membranei externe, legate necovalent de mureină, reglează procesele de permeabilitate prin modificări conformaționale, deoarece funcționează ca adevărate canale moleculare. În mediile cu osmolaritate mică (cele naturale), porinele sunt mai permeabile, iar la bacteriile patogene, în organismul gazdă, porinele au permeabilitate mai mică;
- la bacteriile patogene, în membrana externă se găsesc proteine de virulență: *adezine*, cu rol de fixare a bacteriei pe celulele sensibile;
- LPS are proprietăți *chimiotactic negative* față de fagocite, mărind nivelul virulenței bacteriene și conferă individualitate biochimică și serologică diferitelor tulpini;
- LPS este *antigenic* și induce sinteza anticorpilor specifici cu rol protector.

2.1.6. Protoplaștii bacterieni

Protoplastul este structura organizată a componentelor celulare care ramâne după îndepărtarea peretelui celular și care, păstrându-și viabilitatea realizează procese metabolice, biosinteze și transfer de energie (fig. 9).

Protoplaștii bacterieni au fost obținuți experimental în 1952 de către Salton. El a evidențiat că peretele celular de *Micrococcus lysodeikticus* s-a digerat sub acțiunea lizozimului.

Cea mai folosită metodă de obținere a protoplaștilor este digestia enzimatică cu lizozim a peretelui bacteriilor Gram pozitive. Lizozimul, care se găsește în lacrimi, salivă, albușul de ou, atacă mureina (peptidoglicanul) prin hidroliza legăturilor β 1–4 ale lanțurilor polizaharidice. Rezultă un dizaharid format din N-acetilglucozamină și N-acetilmuramic, la care rămân atașate catenele peptidice.

Protoplastul este foarte sensibil la liza osmotică. Citoplasma celulei bacteriene este o soluție mai

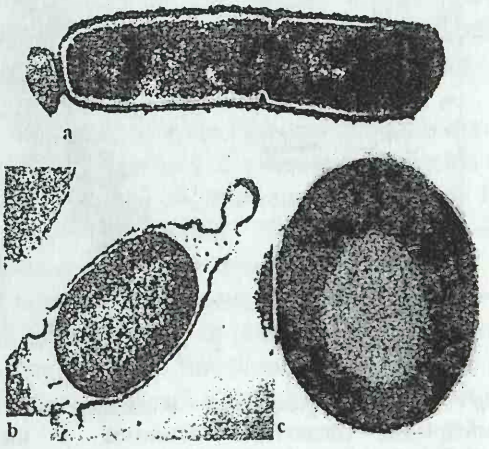


Fig. 9. Imaginea electrono-optică a celulelor de *Bacillus subtilis*. a. În regiunea centrală s-a inițiat formarea septului de diviziune. b. Un stadiu intermediar al degradării peretelui sub acțiunea lizozimului și retracția protoplastului. c. Protoplastul (Mihăescu și colab., 1991).

concentrată (10 mM) decât a mediului de suspensie. Apa trece din compartimentul cu concentrație mică în cel cu concentrație crescută, printr-un proces denumit *osmoză*. Într-un mediu neprotejat osmotic, apa pătrunde în protoplast și se produce *plasmoliza*.

Într-un mediu protejat osmotic, protoplaștii celulelor Gram pozitive își păstrează integritatea structurală, capacitatea respiratorie, de biosinteză, de creștere și diviziune și chiar de replicare a fagului, dacă infecția s-a făcut înainte de îndepărtarea peretelui.

Mediul de protecție osmotică (de protoplastizare) trebuie să conțină o concentrație mare a unor substanțe pentru care membrana celulară este impermeabilă (soluție de sucroză 0,3 M). Dacă mediul de suspensie este hipertonic, protoplastul pierde apa și colapsează, proces denumit *plasmoptiză*.

În condiții speciale de mediu, protoplastul își regenerează peretele și revine la forma originală a celulei, proces denumit *reversie*. Regenerarea este sigură dacă protoplastul mai păstrează un rest de perete, care va funcționa ca primer al resintezei structurii parietale.

Tratamentul cu lizozim nu este eficient pentru conversia bacteriilor Gram negative la protoplaști, datorită membranei externe care împiedică accesul enzimei la peptidoglican. Pentru creșterea eficienței acțiunii enzimatice, celulele se tratează cu EDTA, care diminuează concentrația ionilor de Mg. Se formează *sferoplaști* (celule sferice înconjurate parțial sau total de membrana externă).

2.2. Membrana plasmatică

Membrana plasmatică sau plasmalema (*lemma*, lb. greacă = peliculă) este bariera separatoare a citoplasmei de mediul extern. Consecința imediată a lezării membranei este pierderea componentelor citoplasmatice.

2.2.1. Structura membranei plasmatice

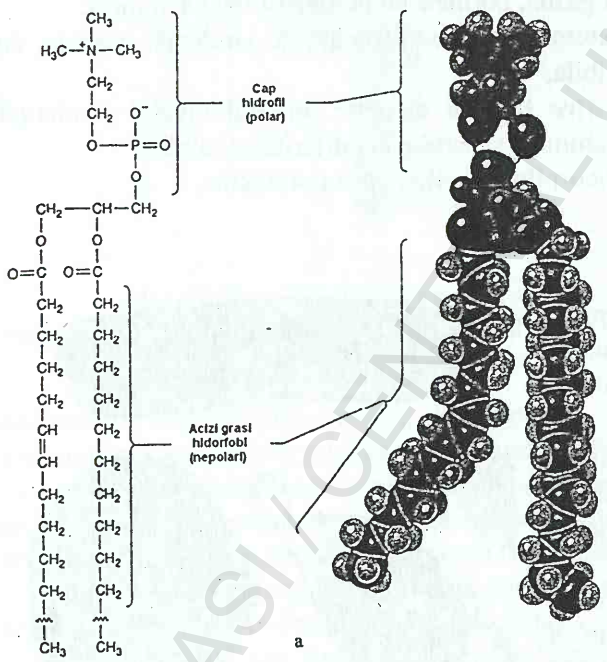


Fig. 10. a. Reprezentarea schematică a moleculei fosfolipidice, componenta structurală a membranei. Fosfolipidele sunt molecule polare. „Cozile" de acizi grași sunt foarte hidrofobe (nu formează legături cu apa) și constituie o barieră de permeabilitate față de moleculele hidrosolubile. „Capul" moleculei este format din gruparea fosfat, legată de o grupare care conține N și din glicerol. Este foarte hidrofil (formează legături cu moleculele de apă).

Grosimea membranei este de 7–10 nm. La microscopul electronic are o structură *trilaminară*, după modelul unitar al membranelor celulare (*unit membrane*) al lui Robertson. Pe baza structurii fine s-a considerat (eronat) că membrana plasmatică este alcătuită din două straturi de proteine, între care se găsește unul lipidic, dar cantitatea de proteine este prea mică pentru a forma două straturi continue.

Membrana celulei procariote conține proteine, glucide și lipide, dar spre deosebire de membrana celulei eucariote, cu puține excepții, nu conține steroli (fig. 10a).

Singer și Nicolson au propus modelul *mozaicului fluid* (fig. 10b) de organizare a membranelor biologice, care consideră că membranele sunt *structuri bidimensionale de proteine globulare și lipide*, cu distribuție orientată, stabilizate de cea de a III-a componentă majoră – *apa*. Moleculele de apă sunt legate prin punți intermoleculare de H, formând o structură de *rețea*. Dizolvarea unei molecule în apă semnifică stabilirea unei continuități între structura chimică a moleculei dizolvate și structura de rețea a apei. Pentru a se integra (dizolva) în structura de rețea a apei, molecula trebuie să formeze o legătură de H cu apa sau să accepte o legătură a acesteia.

IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

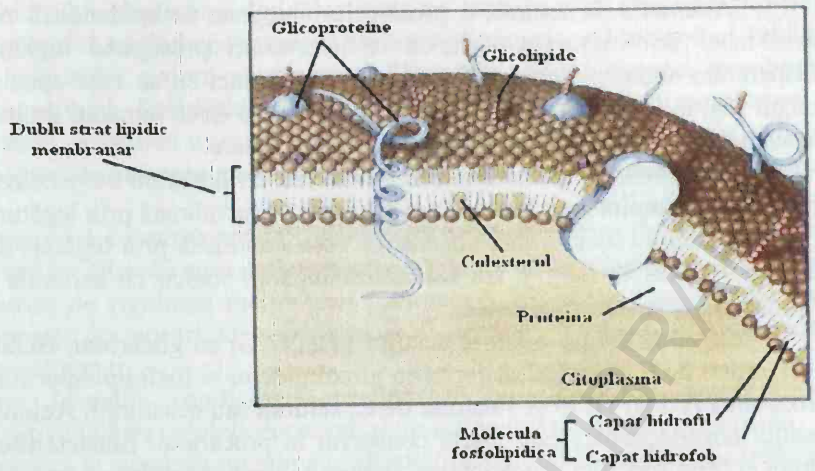


Fig. 10b. Modelul mozaicului fluid al structurii membranei. Fosfolipidele formează un strat dublu, cu componentele hidrofobe orientate spre interior, iar capetele hidrofile constituie suprafaţa internă şi externă a membranei. În „marea" lipidică proteinele plutesc ca nişte "iceberg-uri". Unele se extind în toată grosimea dublului strat lipidic, iar altele sunt ancorate pe faţa internă sau externă. Membrana micoplasmelor şi eucariotelor conţine colesterol.

Membrana este un dublu strat fosfolipidic şi glicolipidic foarte subţire (bidimensional), la care se asociază proteinele membranare. Ansamblul molecular al membranei este asemănat cu un ocean fosfolipidic, în care plutesc ca nişte *iceberg*-uri, proteinele.

Proteinele conferă membranelor multe dintre proprietăţile funcţionale specifice (de exemplu, menţinerea şi utilizarea gradientului transmembranar de H pentru sinteza ATP).

În raport cu dispunerea lor în structura membranei, proteinele sunt *periferice* şi *integrate.*

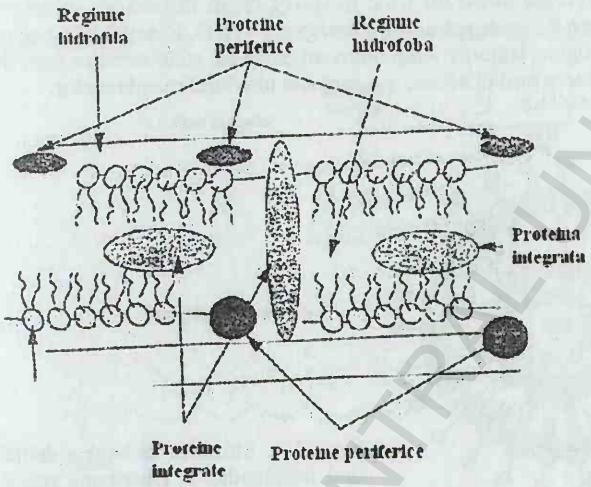


Fig. 11. Reprezentarea schematică a localizării proteinelor membranare. Proteinele periferice sunt în raporturi spaţiale strânse cu capetele hidrofile ale fosfolipidelor. Proteinele integrate sunt localizate în dublul strat fosfolipidic ori au domenii care se extind în regiunile hidrofile (dupa Holt si colab., 1998),

Proteinele *periferice* sunt asociate cu membrana, dar nu au nici o secvenţă inclusă în structura ei. Structura lor este analogă proteinelor hidrosolubile.

Proteinele membranare *integrate* au cel puţin un *domeniu al moleculei situat în regiunea hidrofobă* a stratului lipidic. Ele pot fi dislocate din structura membranei numai sub acţiunea detergenţilor ce solubilizează lipidele.

Clasa proteinelor *integrate* se împarte în două subclase:

1. *Proteinele transmembranare* au o mare parte a masei lor inclusă în dublul strat fosfolipidic, dar expun domenii semnificativ diferite pe ambele feţe ale membranei, ceea ce conferă asimetria funcţională a acesteia.

Ele au o structură heterogenă, deoarece cel puţin un domeniu al moleculei este inclus în mediul *hidrofob* al lipidelor şi trebuie să fie compatibil cu acesta. Secvenţa de 19–23 aminoacizi a domeniului inclus în stratul lipidic este *hidrofobă* şi are configuraţia α-helix (fig. 11).

Domeniile extralipidice ale proteinelor integrate sunt *hidrofile**, ceea ce conferă *asimetria structurală* şi *funcţională* a membranei. Proteinele integrate difuzează liber în planul lateral al matricei lipidice, dar nu trec liber dintr-un strat în altul şi de aceea asimetria funcţională a membranei se păstrează pentru perioade lungi. Aşa se explică permeabilitatea superioară a feţei interne în raport cu faţa externă.

* Biomoleculele sunt amfipatice, adică posedă regiuni bogate în grupări încărcate electric (polare), precum şi regiuni hidrofobe (nepolare). Grupările polare conţin atomi de O, S sau N, ce acţionează ca acceptori de legături de H prin intermediul cărora interacţionează cu alte grupări de semn opus sau cu apa ca solvent. Apa este o moleculă foarte polarizată, având sarcini pozitive şi negative. Moleculele ce poartă grupări electrostatice, ca NH_3 şi COO^- sunt polare şi greu de separat din apă. Proteinele se pliază cu resturile de aminoacizi hidrofobi, spre interior, iar aminoacizii cu grupări polare (Arg, Glu, Ser) se găsesc la suprafaţa moleculei.

BCU CLUJ / CENTRUL UNIVERSITAR

Asimetria structurală a proteinelor integrate se evidențiază pe imagini electrono-optice ale membranei criofracturate. Tehnica criofracturării presupune înghețarea rapidă a membranei la temperatura azotului lichid şi fracturarea membranei cu un cuțit special. Membrana se clivează de-a lungul regiunii hidrofobe a acizilor graşi şi rezultă două jumătăți de membrană, cu un grad accentuat de asimetrie, conferită de proteinele transmembranare.

2. *Proteinele membranare ancorate* au un domeniu ce penetrează dublul strat lipidic, dar nu traversează complet membrana. Sunt ancorate de membrană prin legătură covalentă cu lipidele.

Structura membranei plasmatice este stabilizată prin legături de H şi interacțiuni moleculare hidrofobe. Ionii de Mg şi Ca realizează legături ionice cu sarcinile negative ale fosfolipidelor şi stabilizează structura membranei.

Lipidele conțin esteri ai acizilor graşi (AG) cu glicerolul. Acizii graşi celulari au o catenă de 9–20 atomi de C şi includ majoritatea glicolipidelor şi fosfolipidelor membranare, în a căror structură predomină AG cu l4, l6 şi 18 atomi de C, saturați sau nesaturați. Acidul gras saturat cu 16 atomi de C (acidul hexadecanoic) este foarte conservat la procariote. Eubacteriile conțin circa 20 de AG, unii dintre ei fiind specifici procariotelor. Bacteriile Gram negative au proporție mai mare de AG saturați şi mononesaturați, cu număr par de atomi de C, decât cele Gram pozitive (Magnuson şi colab., 1993). Ultimele au o proporție mai mare de AG cu număr impar de atomi de C. În categoria acizilor graşi nu sunt incluse catenele lungi de 24–90 atomi de C ai acizilor micolici şi nici quinonele izoprenoide.

Fosfolipidele (fosfogliceride) membranelor biologice sunt molecule *amfipatice polare*, deoarece au un *cap polar* (glicerolul) legat cu *cozile nepolare** ale acizilor graşi: *glicerolul* intră în structura de rețea a apei, fiind *hidrofil*, iar *acizii graşi* formează componenta *hidrofobă* a moleculei (fig. 12). Astfel, membrana are două suprafețe polare, cu caracter hidrofil, datorat resturilor de glicerol.

* O moleculă sau un grup de atomi este nepolar dacă îi lipsesc atomii electronegativi – N, O, S, astfel că nu conține grupări cu sarcini electrostatice importante: steroizii şi alte lipide, lanțurile lungi hidrocarbonate ale aminoacizilor Leu, Ileu, Val. Moleculele nepolare au tendința de a se deplasa din apă spre mediul uleios, aşa cum este interiorul membranelor.

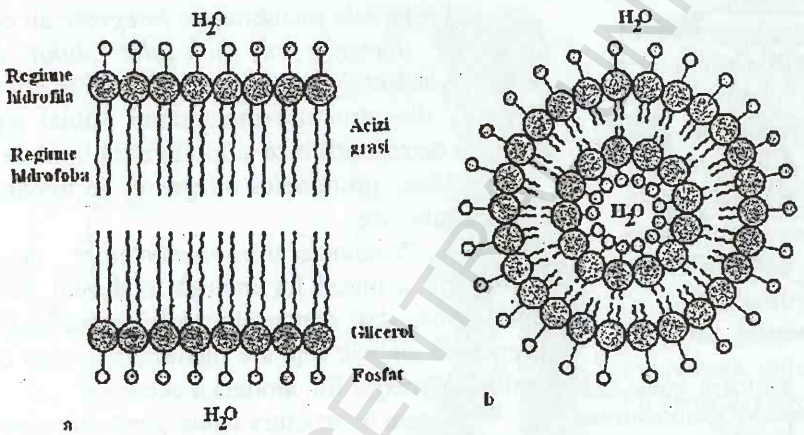


Fig. 12. a. Structura de bază a dublului strat fosfolipidic. *b.* Distribuția stabilă a moleculelor lipidice în apă, cu formarea unei vezicule membranare.

Rolul lipidelor membranare s-a studiat folosind ca model veziculele membranare artificiale sau naturale, ce se formează spontan după spargerea celulelor. În soluție apoasă, lipidele se agregă şi formează spontan structuri în dublu strat: micelii** sferice cu acizii graşi la interior, iar moleculele de glicerol ramân expuse în mediul apos. Miceliile se organizează asemănător în mediul hidrofob (uleios), dar componenta apolară (hidrofobă) se orientează spre mediul de dispersie. Agregatul funcționează ca o barieră impermeabilă pentru trecerea liberă a moleculelor polare în şi din celulă.

** Miceliile sunt particule formate din câteva mii de macromolecule *amfipatice* şi apă. Moleculele amfipatice au o grupare carboxil polară şi o catenă lungă apolară (de exemplu, acizi graşi) şi sunt orientate cu regiunea hidrofobă spre interior, de unde apa este exclusă, iar grupările hidrofile sunt orientate la suprafață, în contact cu apa.

Al II-lea tip de agregat lipidic în apă este dublul strat, în care cele două straturi lipidice formează o lamă bidimensională (fig. 12a). Regiunile hidrofobe ale fiecărui monostrat interacționează reciproc, dar la capete sunt în contact cu apa. Lama dublului strat este relativ instabilă, se pliază şi formează al III-lea tip de agregat, o sferă (vezicală), un liposom, care delimitează un compartiment apos (fig. 12b).

Datorită caracterului hidrofob, deplasarea lipidelor dintr-un strat în altul (mişcare flip-flop) necesită ca un grup polar să părăsească mediul apos şi să se deplaseze în interiorul hidrofob al dublului strat, proces care presupune schimbări majore ale energiei libere. În timpul sintezei membranei bacteriene (ca şi în celulele eucariote), fosfolipidele sunt produse pe faţa internă a membranei şi trebuie să difuzeze în lama externă. Mişcarea transmembranară este facilitată de o familie de proteine (flipaze), care oferă o modalitate de mişcare mai favorabilă energetic şi mult mai rapidă decât mişcarea necatalizată.

Cu excepţia *micoplasmelor* şi a *metanotrofelor*, membrana procariotelor se deosebeşte de cea a eucariotelor prin absenţa *sterolilor*. Sterolii sunt molecule plane, rigide, iar acizii graşi sunt flexibili. Sterolii conferă un grad superior de rigiditate membranei plasmatice. Rigiditatea membranei este necesară celulelor lipsite de perete. La eucariote, rigiditatea ar fi necesară pentru a suporta forţele fizice care se exercită asupra membranei.

Antibioticele polienice (nistatin, candicidin) reacţionează cu sterolii şi destabilizează membrana. De aceea ele sunt active faţă de celulele eucariote şi nu influenţează celulele procariote.

Micoplasmele încorporează în structura membranei *sterolul* disponibil în mediul de creştere şi sunt sensibile la antibioticele polienice.

La unele bacterii, în structura membranei se găsesc molecule asemănătoare structural cu colesterolul care pot avea acelaşi rol de creştere a rigidităţii: *hopanoidele*. Un compus cu distribuţie largă este diploptenul, cu 30 atomi de C.

Membrana citoplasmatică la *Archaea* are o structură electrono-optică trilaminară, dar din punct de vedere chimic este unică prin natura lipidelor.

Lipidele eubacteriilor şi eucariotelor sunt esteri ai acizilor graşi cu glicerolul. Lipidele *Archaea nu conţin acizi graşi* şi sunt de două tipuri: *glicerol-dieteri* şi *diglicerol-tetraeteri,* cu catene izoprenoidice (fig. 13). La C_3 al glicerolului se leagă o grupare *fosfat, sulfat* sau un rest *glucidic*.

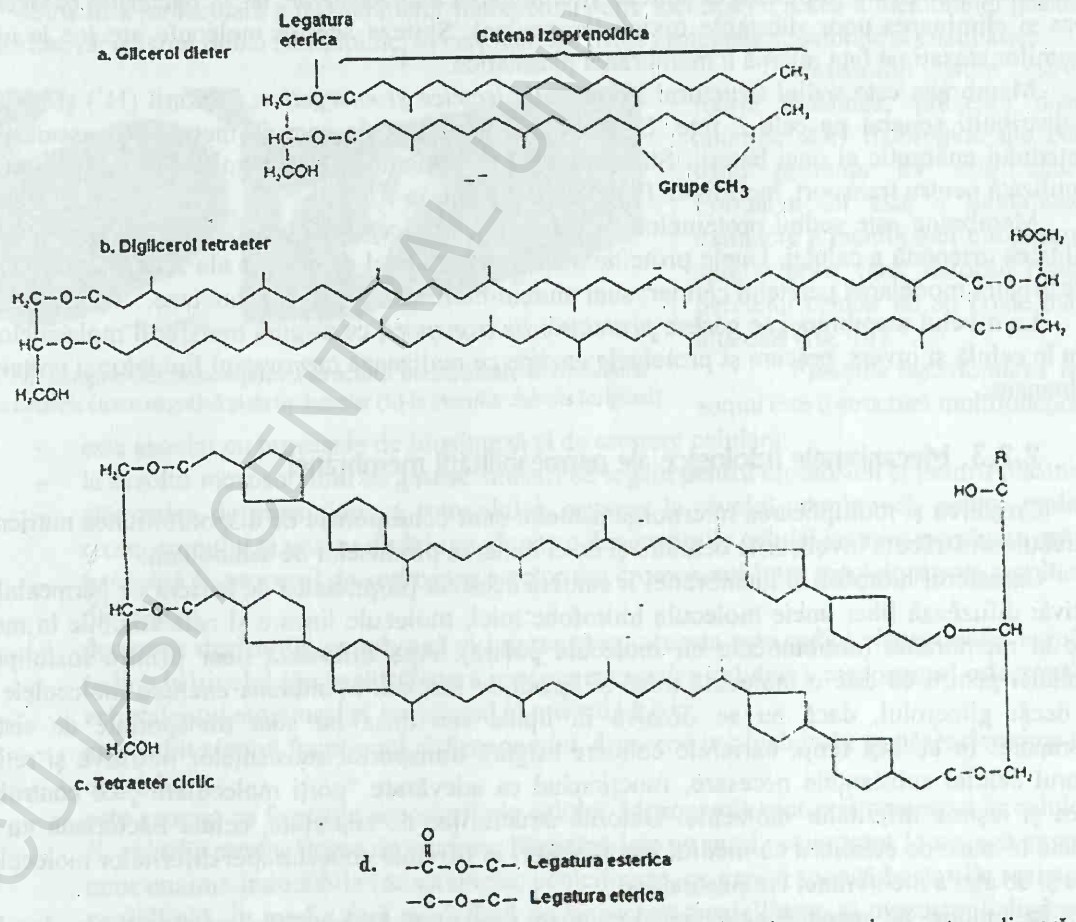


Fig. 13. Lipidele majore la *Archaea*. a. Glicerol dieterii. b. Diglicerol-tetraeteri cu catena lineară. c. Diglicerol-tetraeteri cu 4 inele pentaciclice. d. Catena de C este ataşată totdeauna de glicerol prin legături *eter*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Catenele izoprenoidice au între 15 şi 40 atomi de C. Membrana plasmatică la *Archaea* are două suprafeţe polare, cea internă şi cea externă, datorită resturilor de glicerol, iar interiorul este hidrofob, ca şi la celelalte membrane, dar nu conţine fosfolipide.

Glicerol-dieterii formează stratul dublu lipidic, prezent în structura membranelor celulare. La unele *Archaea* predomină net diglicerol-tetraeterii şi membrana este formată dintr-un *monostrat lipidic*. Diglicerol-tetraeterii sunt echivalentul chimic al dublului strat lipidic, dar diferenţa constă în faptul că cele două straturi sunt legate covalent.

Glicerol-dieterii au catene laterale izoprenoidice de 20 atomi de C, iar diglicerol-tetraeterii au catene laterale de 40 atomi de C. La unele *Archaea*, catenele de C ale diglicerol-tetraeterilor sunt complicate prin existenţa a 4 inele pentaciclice, dar se păstrează lungimea de 40 de atomi de C.

Glicerol-eterii sunt markeri biochimici ai *Archaea*.

2.2.2. Funcţiile membranei plasmatice

Membrana plasmatică este bariera majoră structurală şi de permeabilitate între mediul celular şi cel extern. Membrana este în primul rând bariera de permeabilitate care împiedică difuzia liberă a componentelor citoplasmatice. Permeabilitatea foarte selectivă este asigurată de *asimetria sa funcţională*: este mai permeabilă pe faţa internă, ceea ce asigură menţinerea constanţei mediului intern faţă de cel extern, foarte variabil.

Membrana este sediul *sinergonului respirator* (constituenţii moleculari care realizează procesele de respiraţie celulară şi formează sistemul de transport al electronilor) şi al *sinergonului fotosintetizant*. Dovada structurală a rolului membranei ca suport structural al sinergonului respirator este faptul că la *Azotobacter*, care are cea mai înaltă rată respiratorie, membrana îşi măreşte adaptativ suprafaţa formând numeroase intruzii veziculare.

Membrana este implicată în sinteza şi eliminarea *exoenzimelor*, iar la bacteriile patogene, în sinteza si eliminarea unor substanţe toxice (exotoxine). Sinteza acestor molecule are loc la nivelul ribosomilor ataşaţi pe faţa internă a membranei plasmatice.

Membrana este sediul structural al *sarcinii electrice şi energetice*: protonii (H^+) şi ionii OH^- sunt distribuiţi separat pe cele 2 feţe. Se generează o formă de energie metabolică asemănătoare potenţialului energetic al unei baterii. Starea energetică a membranei denumită *forţă proton-motrice* este utilizată pentru transport, mobilitate flagelară şi biosinteza ATP.

Membrana este sediul proteinelor cu rol de *chemoreceptori*, în special a celor ce au rol în mobilitatea orientată a celulei. Unele proteine membranare au rol de enzime ale sistemului ATP-azic. Altele asigură modelarea peretelui celular: sunt murein-hidrolaze şi murein-sintetaze.

La nivelul membranei se găsesc *proteinele de transport*, ce asigură transferul moleculelor din mediu în celulă şi invers, precum şi proteinele enzime ce realizează *turnover*-ul lipidelor şi proteinelor membranare.

2.2.3. Mecanismele fiziologice ale permeabilităţii membranei

Creşterea şi multiplicarea microorganismelor sunt condiţionate de disponibilitatea nutrienţilor care trebuie să străbată învelişurile celulare şi de eliminarea produselor de catabolism.

Caracterul hidrofob al membranei îi conferă acesteia proprietatea de barieră de permeabilitate selectivă: difuzează liber unele molecule hidrofobe mici, molecule lineare şi cele solubile în mediul lipidic al membranei (antibioticele cu molecula polară). Apa difuzează liber printre fosfolipidele membranei pentru că este o moleculă mică şi lipsită de sarcină. Membrana exclude moleculele mai mari decât glicerolul, dacă nu se dizolvă în lipide sau dacă nu sunt transportate de sisteme membranare. În acelaşi timp, barierele celulare asigură transportul substanţelor nutritive şi reţin în interiorul celulei substanţele necesare, funcţionând ca adevărate "porţi moleculare", ce controlează intrarea şi ieşirea diferitelor molecule. Datorită structurilor de suprafaţă, celula bacteriană nu este niciodată în stare de echilibru cu mediul înconjurător, în privinţa concentraţiei diferitelor molecule de o parte şi de alta a membranei citoplasmatice.

În funcţie de mecanismele fizico-chimice care stau la baza lor, transportul moleculelor (electroliţi şi neelectroliţi) prin membrană se face prin două categorii de procese fiziologice:

– difuzia pasivă
– mecanismele de transfer cu moleculă purtător (Maloney şi colab, 1990; Fath şi Colter, 1993; Paulsen şi colab., 1996).

2.3. Mezosomul

Mezosomul (sau corpul din mijloc) este o structură derivată din membrană, a cărei poziţie în celulă este adesea mediană. Se mai numeşte *plasmalemasom* (corp derivat din membrană).

Pentru ca o structură membranară să poată fi încadrată în categoria mezosomilor trebuie să îndeplinească trei condiţii de bază:

– să derive din membrana citoplasmatică, adică să fie rezultatul unor intruzii ale membranei citoplasmatice, cu care structura mezosomală păstrează permanent legături de continuitate directă;
– să poată fi extruzată în spaţiul dintre membrana plasmatică şi peretele celular, prin creşterea presiunii osmotice a mediului de suspensie;
– să fie asociată cu următoarele procese importante ale celulei:
  a) cu replicarea cromosomului şi cu distribuţia celor doi cromosomi în celulele surori;
  b) cu procesul de sporulare.

S-au descris trei tipuri morfologice de mezosomi: *tubulari, veziculari şi lamelari*. Unii autori consideră că aceste forme sunt reciproc reversibile, realizând un continuum structural.

Mezosomii sunt mai frecvenţi şi au o structură mai complexă, de tip lamelar, la bacteriile Gram pozitive. La cele Gram negative sunt mai rari şi au aspect tubular.

În mediile hipertonice, mezosomii se extruzează în spaţiul dintre membrana citoplasmatică şi peretele celular, ca o dovadă certă a legăturii lor structurale directe cu membrana plasmatică.

Structura moleculară a membranelor mezosomale este identică cu aceea a membranei plasmatice din care derivă: un strat dublu fosfolipidic, în care sunt inclavate proteinele structurale şi enzimatice.

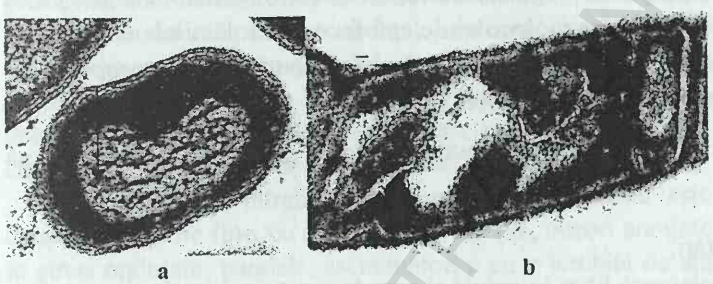


Fig. 14. Imagine electrono-optică a structurii mezosomale de tip tubular (a) la o bacterie Gram negativă şi de tip lamelar (b) la *Bacillus subtilis* (original).

Mezosomii sunt structuri foarte dinamice, prezente doar în anumite stări fiziologice ale celulei, când prezenţa lor este necesară. Formarea lor este o modalitate de extindere a membranei citoplasmatice spre interior care, datorită rigidităţii peretelui celular nu se poate mări pe altă cale (fig. 14).

Funcţiile mezosomului. Mezosomul este o structură multifuncţională:

– este asociat cu procesele de biosinteză şi de creştere celulară;
– la nivelul mezosomului se găsesc situsuri de legare pentru cromosom şi pentru plasmide;
– este calea de transmitere a semnalului, originar la nivelul membranei, pentru replicarea cromosomului şi pentru diviziune, după ce dimensiunile celulei au atins o valoare critică;
– participă la procesul de segregare a celor doi cromosomi între celulele surori rezultate din diviziune;
– deoarece derivă din membrană şi împreună cu aceasta este sediul *sinergonului respirator* (adică la nivelul său se desfăşoară procese energetice celulare), mezosomul este considerat echivalentul structural şi funcţional al mitocondriei;
– este echivalentul funcţional al *lizosomului*, deoarece la nivelul său se găsesc enzime cu rol degradativ;
– este asociat cu funcţiile secretorii ale celulei. Mezosomii sunt mai numeroşi în celulele de *B. subtilis* producătoare de enzime. Participă într-un mod necunoscut la sinteza şi secreţia unor enzime inductibile (de exemplu, penicilinaza, pe care o secretă bacteriile rezistente la penicilină). În mediu fără penicilină nu se secretă penicilinaza şi mezosomii lipsesc, dar apar în celulele care cresc pe mediul ce conţine penicilină.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.4. Citoplasma

Citoplasma celulei bacteriene este un sistem complex reprezentat de soluție propriu-zisă*, de soluție coloidală**, de emulsie*** și de micele****, format din proteine, glucide, apă și substanțe minerale.

* Soluțiile adevărate sunt formate de moleculele mici dizolvate într-un solvent. Moleculele dizolvate nu se pot distinge prin metode fizice de moleculele solventului. Ele conferă soluției (citoplasmei) *presiune osmotică*.

** Soluțiile coloidale sunt formate de moleculele mari, cu dimensiuni între 1–100 nm: soluțiile coloidale sunt opalescente și absorb o parte a razelor de lumină care le străbate lateral.

*** Emulsia este o suspensie de picături mici ale unui lichid în alt lichid, cu care nu este miscibil.

**** Micelele sunt particule formate din macromolecule *amfipatice* și apă. Moleculele amfipatice au o grupare carboxil polară și o catenă lungă apolară (de exemplu, acizi grași).

Electroliții sunt în concentrație mare și sunt reținuți în citoplasmă datorită permeabilității selective a membranei. Concentrația mare a substanțelor dizolvate – organice și anorganice, generează o presiune hidrostatică sau *presiune de turgor*, ce se manifestă în raport cu fața internă a membranei.

* Presiunea de turgor este diferența de presiune osmotică între mediul citoplasmatic și mediul extracelular.

Cele 4 stări fizice ale citoplasmei sunt într-o continuă modificare a raportului lor cantitativ, care în ansamblu, datorită lipsei curenților citoplasmatici, conferă caracterul unui *gel fluid.*

Caracterul de gel al citoplasmei este consecința *stării apei*. Molecula de apă este un *ion dipolar* (zwitterion). O moleculă dipolară are simultan un grup încărcat pozitiv și un grup încărcat negativ (aminoacizii individuali, dar și moleculele proteice au o grupare cu sarcină pozitivă (NH_2^+) și o grupare încărcată negativ (COO^-) Proprietatea de polaritate a apei este foarte importantă, deoarece este mediul în care se dizolvă multe molecule polare. Apa formează o rețea tridimensională atât cu ea însăși, cât și cu macromoleculele. Polaritatea înaltă a moleculei de apă face ca moleculele nepolare să formeze agregate stabile. Faptul că moleculele de apă sunt legate în rețea condiționează proprietățile sale de solvent, tensiunea superficială* înaltă și căldura specifică înaltă.

* Tensiunea superficială este forța elastică ce se manifestă la suprafața unui lichid, ce tinde să se micșoreze la un minim posibil în contact cu aerul.

În celulă, apa se găsește în două stări:

- *apa liberă* este cea care se deplasează liber în celulă și care la creșterea presiunii osmotice a mediului extracelular trece în afara celulei;
- *apa legată* (de hidratare) în structura gelului citoplasmatic.

În celula bacteriană vegetativă, apa liberă (care constituie circa 70% din totalul apei) creează un mediu de suspensie pentru macromolecule.

Apa liberă este foarte *mobilă*, iar cea din structura gelului este practic imobilă. Starea de gel a citoplasmei păstrează componentele celulare separate spațial (Wiggins, 1990).

Absența curenților citoplasmatici are ca rezultat imobilitatea conținutului celular.

La celulele bacteriene tinere, aflate în faza logaritmică de creștere, citoplasma este fin granulară, densă și omogenă, intens *bazofilă*, datorită conținutului ridicat de acizi nucleici. ARN citoplasmatic este reprezentat de ARNr (80%), ARNt (10–20%) și ARNm (2%).

În citoplasma celulelor tinere se găsesc, într-o proporție mare, proteinele-factori de creștere implicate în sinteza noilor proteine.

În citoplasma celulelor îmbătrânite apar materiale de incluzie și vacuole. Aspectul devine granular neomogen, iar bazofilia se diminuează datorită scăderii până la 0 a ratei sintezei ARN, precum și datorită reducerii treptate a cantității existente. Afinitatea pentru coloranții bazici este neuniformă.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.5. Nucleoidul bacterian

Aparatul genetic bacterian este reprezentat de două tipuri de structuri: *nucleoidul*, care din punct de vedere structural şi funcţional corespunde *cromosomului* şi *plasmidele*. Corespunzător celor două tipuri de structuri, determinanţii genetici sunt de două categorii: *gene esenţiale* (eucromosomale), localizate în structura cromosomului şi *genele accesorii*, cu localizare plasmidială sau în structura elementelor genetice transpozabile şi a unor fagi.

Cromosomul bacterian, ca structură genetică esenţială, poartă informaţia genetică ce asigură desfăşurarea funcţiilor esenţiale pentru existenţa celulei, adică setul de determinanţi minim necesari pentru a codifica arhitectura celulei şi pentru a asigura metabolismul energetic şi de biosinteză, creşterea, diviziunea şi reglarea diferitelor activităţi celulare.

Structurile genetice extracromosomale (plasmidele) poartă informaţia genetică accesorie, "de confort", care permite celulei o mai bună adaptare la condiţii de mediu noi sau modificate.

Genomul *E. coli* K_{12} este alcătuit din circa 4400 de gene. Pentru creşterea în laborator ar fi necesare numai câteva sute. Genomul este rezultatul acţiunii forţelor selective pentru eficienţă metabolică şi adaptabilitate.

Spre deosebire de celulele eucariote care au un nucleu cu structură bine definită, delimitat de o membrană şi conţinând un număr definit de cromosomi, "nucleul" bacterian reprezintă o formă primitivă de organizare, lipsită de membrană, inclavată direct în citoplasmă. Particularitatea structurii nucleare – lipsa membranei delimitante – este fundamentală pentru organizarea celulară de tip *procariot*, căreia îi aparţin bacteriile.

Datorită caracterelor structurale particulare, "nucleul" bacterian a primit diferite denumiri: *nucleoid, material nuclear, nucleoplasmă, echivalent nuclear* sau chiar *nucleu*, prin analogie cu nucleul celulei eucariote, *lineom* sau *genofor*.

Pe micrografiile electrono-optice, materialul nuclear este localizat, în mod obişnuit, în partea centrală a celulei şi se distinge de citoplasma înconjurătoare, prin densitatea sa mai mică la fluxul de electroni, în contrast cu celula eucariotă, la care nucleul este mai electronodens, comparativ cu citoplasma. Celula procariotă are un *contrast invers* al structurilor sale, în raport cu celula eucariotă, care se datorează atât faptului ca *ADN nu este asociat cu proteine*, cât şi *densităţii foarte mari a citoplasmei bacteriene*.

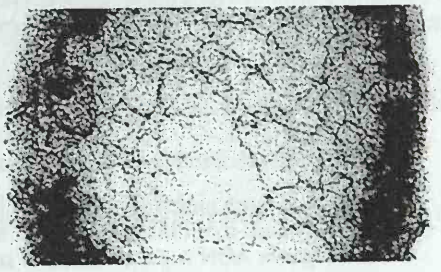


Fig. 15. Imagine electrono-optică a nucleoidului la *B. subtilis*, x 150.000 (original).

Pe secţiuni ultrafine, zona materialului nuclear este ocupată de *fibrile* fine, cu diametrul de 2,5 nm, uneori aranjate în şiruri ondulate, paralele, asemănătoare cu o jurubiţă de aţă (fig. 15) şi sunt sensibile la hidroliza cu DN-ază.

2.5.1. Organizarea fizică a cromosomului

Materialul nuclear poate fi izolat din celulă sub forma unui *corpuscul dens* şi compact. Corpusculul corespunde stării "împachetate" a cromosomului. După tratamentul moderat cu RN-ază şi proteaze, din structura compactă se izolează molecula de ADN sub forma *cromosomului circular închis covalent* (60%), ARNm, ARNt (30%) şi ARN-polimeraza (l0%) (Robinow şi Kellenberger, 1994). Cromosomul are o lungime de l400 μm şi diametrul de 2,5 nm, corespunzător diametrului moleculei de ADN dublu catenar. Circularitatea este o condiţie a existenţei sale. Sub această formă, molecula de ADN este rezistentă la acţiunea exonucleazelor citoplasmatice, active asupra moleculelor lineare de ADN. Cromosomul bacterian este cea mai mare moleculă biologică. Prin lungimea sa, molecula de ADN cromosomal depăşeşte de circa l000 de ori lungimea celulei bacteriene.

Raportată la dimensiunile mici ale unei bacterii, molecula de ADN este supusă constrângerilor topologice* de *supraspiralizare (suprarăsucire)*, prin care este "împachetată" pentru a forma un corp compact de l500 de ori mai mic (Krawiec şi Riley, 1990).

* Topologia este o ramură a matematicii care studiază proprietăţile corpurilor geometrice, proprietăţi care rămân nealterate după răsucirea sau contorsionarea lor.

Pentru a ocupa un volum atât de mic, molecula de ADN se împachetează după norme foarte riguroase, aşa încât, în orice moment, oricare dintre cele 3000–5000 de gene cromosomale, să fie accesibilă sistemelor celulare de transcriere şi traducere.

Moleculele de ARN au un rol esenţial în menţinerea stării compacte a ADN. S-au propus mai multe modele de împachetare a moleculei de ADN. Cel mai acceptat este acela propus de Pettijohn şi Hecht (1974), citaţi de Mathews, 1992, în acord cu care, împachetarea se face printr-un proces de *pliere si supraspiralizare* (formare de suprahelice). Se formează astfel o structură condensată, menţinută prin acţiunea asociată a proteinelor din nucleoid.

Modelul de împachetare prin pliere şi supraspiralizare încearcă să explice mecanismul molecular al drumului invers, de la structura circulară relaxată a macromoleculei de ADN, la arhitectura corpusculului dens existent în celulă.

Pentru împachetare, se consideră că molecula dublu catenară, circulară, iniţial *se pliază* în 40–60 de *domenii* egale. Punctele de pliere sunt determinate de molecule de *ARN nascente*, legate cu una dintre extremităţi de ARN-polimerază. Moleculele de ARNr şi ARNt, împreună cu ARN-polimeraza participă la formarea şi menţinerea domeniilor de pliere. Prin pliere, diametrul cromosomului scade la circa 30 μm. În interiorul fiecărui domeniu de pliere are loc un proces de *supraspiralizare.* Supraspiralizarea este o stare fizică în care molecula de ADN se pliază prin răsucire în jurul propriei axe (fig. 16).

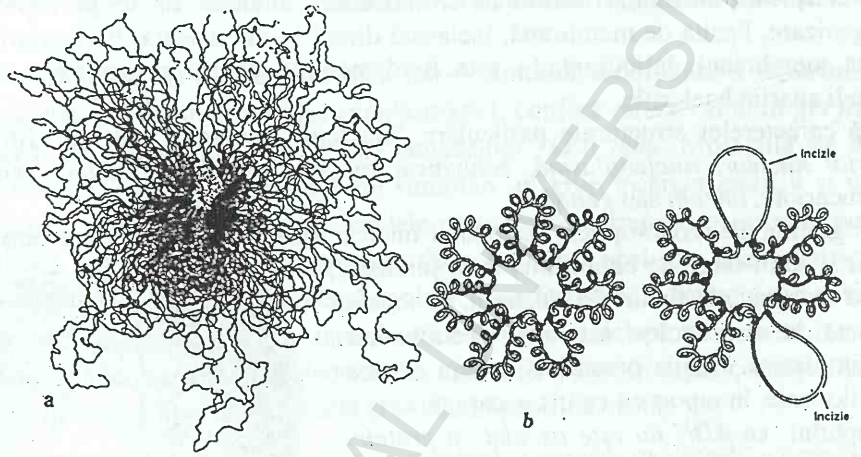


Fig. 16. Reprezentarea schematică a diferitelor stări fizice ale cromosomului bacterian. a. Bucle multiple de ADN dintr-o celulă spartă prin şoc hipotonic, răspândite pe suportul reprezentat de o proteină bazică. b. Diagrama ADN supraspiralizat. În stânga sunt reprezentate 7 domenii (numărul real este de circa 50) supraspiralizate, menţinute astfel de un set de proteine, care stabilizează capetele unui domeniu. Buclele mici ale fiecărui domeniu pot fi spiralizate în jurul unui set de proteine nucleosomale, reducând tensiunea în dublul helix, creată prin supraspiralizare. În dreapta, două domenii au fost incizate la nivelul unei catene, permiţând rotaţia helixului şi relaxarea supraspiralei (după Pettijohn şi Snider, 1985).

Într-o etapă ulterioară, domeniile suprahelicale se pliază din nou unul faţă de altul, superior şi inferior faţă de un plan orizontal. Astfel, rezultă masa compactă a nucleoidului, aşa cum se evidenţiază la microscopul optic şi se poate izola din celulă.

ADN bacterian, ca şi la eucariote este asociat cu proteine.

În celula eucariotă, corpii proteici în jurul cărora se spiralizează dubla catenă de ADN se numesc *nucleosomi*. La bacterii, organizarea moleculară a nucleosomilor este puţin cunoscută. Se pare că ei conţin două proteine de legare pentru ADN: proteina HU (*H*elix *U*nwinding) şi proteina I. Ele se găsesc în structura nucleosomului, în proporţia de o moleculă la 150–200 perechi de baze.

Bacteriile au o cantitate mică de ADN *neinformaţional*. Secvenţele repetate la bacterii pot fi:

- *homopolimerice* (multimeri ai uneia din cele 4 nucleotide: poli-A, poli-G, poli-T, poli-C), cu o lungime de până la 42 nucleotide;
- *secvenţe scurte de 2–6 baze.* Dacă sunt localizate în interiorul genelor şi au o secvenţă diferită de 3 sau 6 nucleotide, modifică potenţialul codificator al genei.
- *secvenţe mai lungi de 8 nucleotide*. La numeroase bacterii s-au evidenţiat câteva sute de secvenţe repetitive palindromice de 20–40 de baze, cu localizare extragenică, care delimitează unele gene şi a căror funcţie nu este cunoscută.

La bacterii nu s-au identificat gene înnădite. Comparând secvenţele genelor ce codifică proteine bine conservate în evoluţie, reiese că intronii au fost prezenţi în genele ancestrale, dar s-au pierdut în evoluţia organismelor mici, care şi-au redus la minimum cantitatea de ADN şi s-au adaptat la o creştere foarte rapidă (eubacterii şi levuri).

Genele bacteriene sunt strâns împachetate: se poate estima că circa 30% dintre ele se suprapun parţial cu genele învecinate.

În mod obişnuit, în celula bacteriană se găseşte un singur cromosom, dar în culturi tinere, pe medii care oferă condiţii optime de creştere, celulele apar multinucleate, având 2-4 cromosomi, identici genetic, deoarece provin prin replicarea cromosomului parental, astfel că, în esenţă, bacteriile sunt *organisme haploide*. Situaţia de celulă polinucleată este temporară şi este rezultatul lipsei de sincronizare între procesele de diviziune nucleară şi diviziune celulară.

Cromosomul bacterian este un singur *replicon*[*], deoarece se replică de la o singură origine.

2.6. Ribosomii

Ribosomii sunt particule ribonucleoproteice cu funcţie enzimatică ce catalizează formarea legăturilor peptidice, localizate în citoplasmă. La microscopul electronic au formă sferică, cu diametrul de 20 nm.

Pe baza constantei de sedimentare[*] (S) se disting următoarele categorii de ribosomi: a) *ribosomi 80 S,* în citoplasma celulelor eucariote; b) *ribosomi mitocondriali* şi *cloroplastici,* între 55 S la mamifere şi 75 S la plantele superioare; c) *ribosomii archaea*, de 70 S, asemănători din punct de vedere funcţional cu ribosomii 80 S ai eucariotelor, datorită absenţei sensibilităţii la streptomicină şi cloramfenicol şi prin sensibilitatea la toxina diftrică; d) *ribosomii eubacteriilor*, de 70 S.

[*] Simbolul S semnifică *viteza de sedimentare a unei particule sau a unei molecule prin tehnica ultracentrifugării.* Unitatea Svedberg (inventatorul centrifugii) este unitatea de timp (de 1 x 10^{-13} secunde) în care sunt exprimaţi coeficienţii de sedimentare (valorile S) ai unei molecule într-un câmp gravitaţional. Viteza de sedimentare în câmpul gravitaţional este dependentă de două proprietăţi fizice ale moleculei:

– gr. mol. (M): cu cât gr. mol. creşte, cu atât creşte şi viteza de sedimentare;

– aspectul moleculei: o moleculă aerodinamică se deplasează mai repede decât una sferică. O moleculă mai compactă – întâmpină o forţă de frecare mai mică şi se deplasează mai repede.

Raportul dintre viteza de deplasare a moleculei şi forţa centrifugă aplicată se numeşte *coeficient de sedimentare (S).*

S = Viteza/Forţa centrifugă

Valoarea lui S pentru o macromoleculă este aceiaşi în diferite soluţii, fiind cuprinsă, în funcţie de gr. mol., între 1 x 10^{-13} secunde şi 100 x 10^{-13} secunde.

Numărul ribosomilor în celula bacteriană este corelat cu activitatea ei fiziologică: este mic în celulele în repaus, dar creşte foarte mult în celulele fiziologic active (în medie 20000 ribosomi/celulă, cu variaţii între 15–10000).

Ribosomii sunt structuri *dinamice*, calitate ce se reflectă în capacitatea lor de a se disocia în două subunităţi, de 30 S şi 50 S şi de a se reasocia. Disocierea şi reasocierea sunt corelate cu variaţia concentraţiei ionilor de Mg: creşterea concentraţiei ionilor favorizează asocierea, iar scăderea concentraţiei lor produce disocierea. Circa 10% din numărul total de ribosomi sunt asamblaţi, liberi în citoplasmă. Ei sintetizează *proteinele structurale.* Alţi 10% se găsesc sub forma subunităţilor disociate, iar restul de 80% sunt *polisomi.*

Ribosomii au două localizări: liberi în citoplasmă sau ataşaţi feţei interne a membranei citoplasmatice. La nivelul celor ataşaţi se sintetizează proteinele de export.

Din punct de vedere biochimic, ribosomii bacterieni conţin circa 55 de tipuri de molecule proteice şi trei tipuri de molecule de ARNr. Ribosomul este un polianion mare (sarcinile negative conferite de grupările fosfat), deoarece ARN reprezintă 2/3 din componentele sale.

Studiile privind structura funcţională a ribosomilor s-au făcut cu două metode foarte sensibile: difracţia cu neutroni şi imunoelectronomicroscopia.

Subunitatea mică 30 S cuprinde (la *E. coli*), 21 tipuri de molecule proteice (S_1–S_{21}), în ordinea descreşterii mărimii, cu gr. mol. între 60 kDa şi 8 kDa şi o moleculă de *ARNr 16 S*, alcătuită din circa 1600 nucleotide.

Subunitatea mare, 50 S conține (la *E. coli*), 34 tipuri de molecule proteice (L_1 – L_{34}, L = *L*arge), cu gr. mol. cuprinsă între 9–28,5 kDa şi două molecule de *ARNr*, de *23 S* (2900 nucleotide) şi respectiv *5 S* (120 nucleotide). Cele două tipuri de molecule de ARN provin prin clivarea unui precursor comun, de 30 S. Structura terțiară (pliată) a ARNr este stabilizată prin 3 tipuri de interacțiuni: ionii de Mg ce formează punți între două sau mai multe grupări fosfat; interacțiunile ARN-ARN; interacțiunile ARN-proteine.

ARNr este transcris din 7 operoni (rrn), fiecare cu doi promotori în tandem (P_1 şi P_2), din care sunt transcrise copiile 16 S, 23 S şi 5 S.

Sinteza ARNr este controlată de concentrația aminoacizilor în celulă: rata sintezei ARNr este dependentă de rata de aprovizionare cu aminoacizi, corelată direct cu capacitatea ribosomilor de a consuma aminoacizii în sinteza proteinelor. Dacă un singur aminoacid lipseşte, sinteza proteinelor ribosomale este stopată şi celula nu mai asamblează ribosomi.

Cele 55 de tipuri de *proteine ribosomale* intră în structura ribosomului într-un singur exemplar (o singură moleculă din fiecare tip). Unele au rol *structural*, fiind esențiale pentru asamblarea ribosomului, altele au rol *funcțional*, permițând legarea ARNm în procesul traducerii şi sintezei lanțului proteic. La *E. coli*, în fiecare subunitate ribosomală, raportul ARN-proteine este 2/1, iar la alte bacterii, raportul este 2/3.

Moleculele componente au o *distribuție fixă*, riguroasă în structura ribosomului. ARNr este pliat într-o structură tridimensională ce formează regiunea centrală a ribosomului şi determină aspectul său. Proteinele sunt localizate în general la suprafața ribosomului, în depresiunile pe care le creează ARN pliat. Unele proteine conțin *domenii globulare*, localizate la suprafață, ce trimit extensii în regiunea centrală a ribosomului. Interacțiunile fixe ale componentelor condiționează procesele de autoasamblare a ribosomilor.

Ribosomii reprezintă componenta esențială a sistemului de traducere a informației genetice. Ei sunt adevăratele "fabrici" de proteine ale celulei, având rolul de a menține atât molecula de ARNm, cât şi complexul aminoacil-ARNt, într-o orientare corespunzătoare pentru a permite atât citirea mesajului, cât şi formarea legăturilor peptidice.

Ribosomii se asociază în polisomi (poliribosomi), adică grupări funcționale formate din 4–50 unități ribosomale. Dimensiunile polisomilor variază în funcție de lungimea ARNm. Polisomii sintetizează concomitent mai multe molecule proteice pe aceeaşi moleculă de ARNm.

2.6.1. Particularitățile sintezei proteinelor la bacterii

În celula eucariotă, transcrierea şi traducerea informației genetice sunt evenimente separate în timp şi spațiu, datorită compartimentării spațiului celular.

În celula procariotă, ribosomii au relații spațiale strânse cu ADN, deoarece transcrierea şi traducerea informației sunt două procese intim coordonate, care se desfăşoară aproape concomitent.

Transcrierea moleculei de ARNm durează circa 1 minut. Rata traducerii este controlată de rata transcrierii. Cele două procese sunt intim corelate şi se petrec cvasisimultan.

Traducerea este procesul ce constă în conversia mesajului secvenței bazelor ARNm în secvența aminoacizilor catenei polipeptidice. Structura ribosomului, capacitatea sa de a determina poziția ARNt pe ARNm, precum şi cataliza legăturii peptidice sunt determinate de ARNr şi nu de proteine.

Traducerea cuprinde 4 faze: inițierea, alungirea, terminarea şi reciclarea ribosomilor.

La bacterii, traducerea începe foarte repede, deoarece ARNm are o durată funcțională scurtă (1–2 minute), fiind degradat de nucleaze (la eucariote ARNm are stabilitate de ordinul orelor). Pentru a compensa instabilitatea ARNm, traducerea se inițiază timpuriu: complexul de inițiere se ataşează la capătul 5' al mesajului, înainte de transcrierea capătului 3'. Ulterior se ataşează succesiv alți ribosomi, rezultând structuri polisomice. Fiecare ribosom este legat de o moleculă proteică nascentă, a cărei lungime este direct proporțională cu lungimea mesajului pe care ribosomul l-a citit. După ce a citit integral informația ARNm, ribosomul se desprinde din polisom, eliberând polipeptidul sintetizat (Laursen şi colab., 2005) (fig. 17).

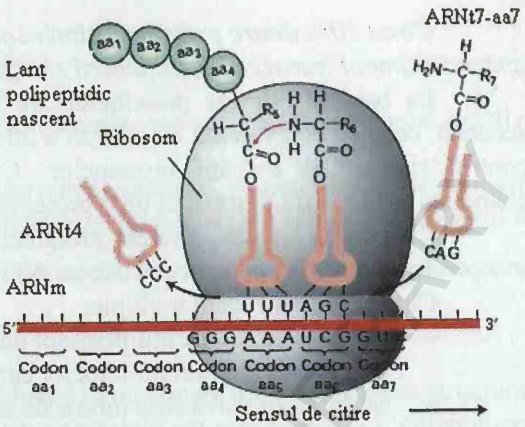


Fig. 17. Funcțiile ribosomului în biosinteza proteinelor. ARNm este tradus prin acțiunea cooperantă a ARNt și a ribosomului. Prin secvența anticodon, ARNt se leagă la codonii complementari a ARNm. Formarea unei legături peptidice între gruparea NH_2 a ARNt-aa nou venit și gruparea COOH terminală a catenei polipeptidice în creștere este catalizată de una dintre moleculele de ARNr (R = grupare laterală; aa = aminoacid, după Lodish, 5th Edition).

Cuplarea transcrierii cu traducerea are două consecințe: a) accelerează rata sintezei proteice, în sensul că traducerea nu trebuie să aștepte eliberarea ARNm de pe matrița de ADN; b) buclele de ADN sunt conectate la membrana citoplasmatică.

Pe medii nutritive bogate, cele mai multe celule bacteriene sintetizează și secretă *exoproteine,* în special în faza staționară a culturii. Proteinele pentru "export" se sintetizează pe ribosomii atașați membranei plasmatice.

2.6.2. Secreția proteinelor extracelulare la bacterii

Multe proteine rămân solubile în citoplasmă, iar altele sunt secretate prin membrana citoplasmatică.

Termenul de "secreție" semnifică trecerea unei molecule de la locul sintezei sale (citoplasma), prin membrană, la exteriorul celulei Gram pozitive sau în spațiul periplasmic al celulei Gram negative, iar cel de "translocație" semnifică transferul extracitoplasmatic al unei molecule care rămâne legată de membrană.

Toate celulele, eucariote și procariote secretă (exportă) proteine în spațiul extracelular.

La bacterii, proteinele pentru *export* se sintetizează pe ribosomii asociați membranei plasmatice. Sinteza începe cu o *secvență semnal*, de 18–35 aminoacizi, la capătul N-terminal. Prin secvența peptidică semnal, proteinele pentru export se deosebesc de cele citoplasmatice și se orientează spre calea de export. Orientarea este rezultatul legării peptidului semnal, de membrană, fie direct, fie prin intermediul unei proteine citoplasmatice denumită *chaperone*[*].

[*] Chaperonii (*chaperon*, lb. engleză = a însoți, a supraveghea) s-au definit ca o familie de proteine celulare care *mediază plierea corectă* a altor polipeptide și uneori asamblarea lor în structuri oligomere, dar care nu sunt componente ale structurilor funcționale finale (Craig și colab., 1993). Multe proteine se *pliază spontan*, dar plierea inițială a unui număr mare de proteine celulare necesită asistența chaperonilor. Proteinele care s-au pliat greșit sunt degradate proteolitic.

Unele proteine destinate exportului *nu apar niciodată în citoplasmă*, ceea ce sugerează că secreția lor se face pe măsură ce sunt sintetizate. Acestea sunt molecule relativ mici (20–40 kDa) și sunt *flexibile* pentru că nu au legături S-S și, de cele mai multe ori, nici componentă glucidică. Pentru aceaste proteine, *translocația este cotranslațională*. Secvența semnal hidrofobă N-terminală se angajează în traversarea membranei, înainte ca restul moleculei să fie sintetizată. După ce secvența semnal ajunge pe suprafața externă a membranei plasmatice, este clivată și digerată, iar proteinele exportate rămân asociate membranei, până ce plierea este completă.

Alte molecule se sintetizează complet înainte de începerea exportului. După terminarea sintezei, moleculele destinate exportului *nu dobândesc configurația terțiară* în citoplasmă, deoarece factori proteici din categoria chaperonilor, interacționează cu polipeptidele nascente și blochează plierea lor, astfel încât proteinele sunt menținute într-o configurație parțial nepliată, compatibilă cu transferul.

Circa 20% dintre proteinele sintetizate nu ajung la destinația finală, datorită erorilor care au apărut în timpul transcrierii, traducerii sau pentru că nu s-au pliat corect.

La bacterii, sinteza proteinelor are loc cu o rată foarte înaltă: 15–20 aminoacizi/ribosom/ secundă, ceea ce echivalează cu sinteza a 30.000 polipeptide/min. Rata înaltă a traducerii necesită un control riguros al calității proteinelor. Circa 30% din totalul proteinelor, necesită asistența chaperonilor. Decizia destinației unei proteine (pliere-degradare) trebuie luată rapid.

Chaperonii asistă plierea proteinelor în periplasmă, într-o manieră cel mai probabil independentă de ATP, deoarece existența ATP în periplasmă este foarte improbabilă.

Chaperonii au funcții multiple:

- interacționează cu polipeptidul nascent şi previn adoptarea conformației incorecte, până la terminarea sintezei proteinelor care rămân în citoplasmă;
- asistă asamblarea structurilor de suprafață ale celulei: flageli, fimbrii, pili;
- asistă asamblarea OMP şi secreția proteinelor în mediu;
- au rol important în replierea proteinelor denaturate, constituind un mecanism important de protecție față de agentul termic sau alte condiții de stress. Unele molecule chaperone sunt sintetizate specific în condițiile care duc la acumularea proteinelor denaturate şi se numesc *proteine de şoc termic*.

Molecula precursoare este orientată spre situsul său membranar specific, prin intermediul peptidului semnal, al chaperonului sau al ambelor tipuri de molecule.

Proteinele structurilor de înveliş sunt sintetizate de asemenea, pe polisomii ataşați membranei citoplasmatice. Pe măsură ce sunt sintetizate, catenele peptidice nascente sunt transferate în grosimea membranei. Unele se termină în membrana internă, iar altele în spațiul periplasmic sau în membrana externă.

Chiar şi fosfolipidele apar inițial în membrana internă şi ulterior difuzează spre membrana externă.

La bacteriile Gram negative, translocația este un proces complex, deoarece moleculele trec în spațiul periplasmic, printr-un proces dependent de energie (Pugsley, 1993). O proteină de translocație (Sec A) localizată în membrana internă, leagă şi hidrolizează ATP. Energia eliberată este utilizată pentru inițierea translocației prin membrana citoplasmatică. Cele mai multe proteine secretate de bacteriile Gram negative ramân în spațiul periplasmic şi au o semnificație metabolică (sunt enzime degradative). Majoritatea sunt proteaze şi furnizează nutrienți asimilabili pentru celulă. Membrana externă a peretelui celular nu are sursa de energie necesară excreției. Din această cauză, o proteină translocată în spațiul periplasmic printr-un proces dependent de energie, nu poate fi translocată printr-un mecanism similar, prin membrana externă, ceea ce demonstrează intervenția unor proteine specifice de translocație ale membranei externe.

La bacteriile Gram pozitive, proteinele destinate membranei citoplasmatice şi peretelui celular se sintetizează fără secvențe semnal. Prin analogie cu exportul proteinelor la *E. coli*, proteinele membranei citoplasmatice sunt integrate spontan, prin interacțiuni ionice şi hidrofobe.

Proteinele secretate sunt în special enzime degradative: proteaze, amilaze, RN-aza, levan-sucraza.

Proteinele de export se sintetizează cu o secvență semnal, de 18–35 aminoacizi, cu capătul amino încărcat pozitiv, urmat de o secvență hidrofobă, pe ribosomii asociați membranei citoplasmatice. Mecanismul de export al exoproteinelor, la *B. subtilis* este probabil, asemănător cu cel de la *E. coli*.

La *B. subtilis*, proteinele translocate prin membrană sunt supuse clivajului secvenței semnal şi rămân legate de peretele celular sau sunt eliberate în mediul extern (Simonen şi Palva, 1993).

Mecanismul de export al exoproteinelor este complicat de faptul că, unele specii de *Bacillus* (dar nu *B. subtilis)* şi la numeroase tulpini Gram negative, la exteriorul peptidoglicanului se găseşte un strat proteic (stratul S) prevăzut cu pori, care permit trecerea proteinelor.

Unele proteine se sintetizează cu o secvență suplimentară de aminoacizi, localizată între peptidul semnal şi proteina propriu-zisă, denumită *propeptid.* Unele propeptide sunt lungi, altele scurte. Cele lungi sunt caracteristice proteazelor. Exoproteazele la *B. subtilis* sunt sintetizate ca *preproenzime*, adică au atât secvența semnal, cât şi propeptidul. Propeptidul pare a avea mai multe funcții:

– în excreția moleculei de exoprotează;
– împiedică activarea enzimei în timpul secreției;
– leagă proteaza de membrana citoplasmatică.

Datorită secvenței propeptidului, la procariote, proteazele, sunt secretate sub forma inactivă, ca *zimogen*, la fel ca și la eucariote,

Propeptidele scurte sunt formate din câteva resturi de aminoacizi. Funcția lor nu se cunoaște. După translocație, exoproteinele sunt eliberate în mediu cu propeptidele scurte atașate, dar clivajul lor survine imediat.

2.7. Sporul

Sporul este o forma primitivă de diferențiere celulară, care constă în reorganizarea structurală și funcțională a celulei vegetative și formarea unui nou tip de celulă, cu proprietăți noi. Diferențierea celulară este un proces biologic fundamental.

Sporii se formează la bacteriile cilindrice: totdeauna la bacilii anaerobi din genul *Clostridium* și la actinobacterii, facultativ la cei aerobi din genul *Bacillus* (fig. 18), excepțional la coci (*Sporosarcina)*. Toate bacteriile sporulate sunt Gram pozitive. Sporularea este condiționată de existența unui perete mureinic gros.

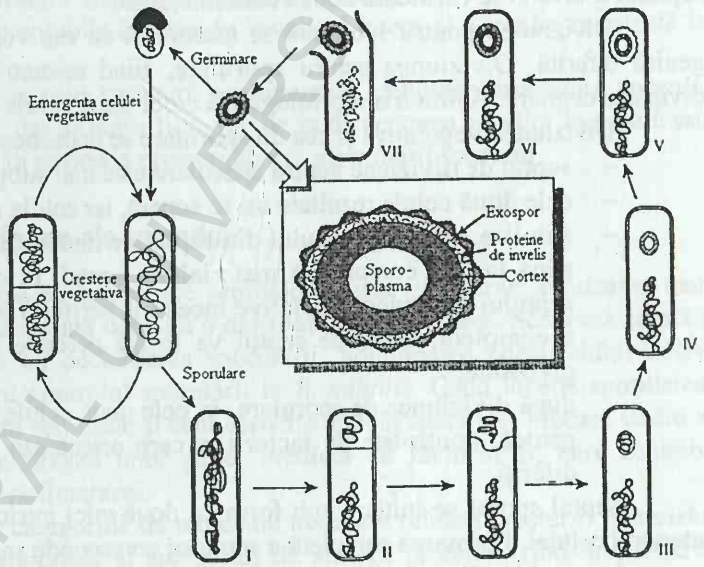


Fig. 18. Reprezentarea schematică a etapelor de formare a endosporului.

Există circa l0 tipuri de spori, ce se deosebesc prin modul de formare, prin structură și prin gradul de rezistență la factorii de mediu. Cel mai caracteristic este *endosporul*, denumit astfel deoarece se formează în interiorul unei celule vegetative.

La actinobacterii se formează câteva tipuri de spori: *artrospori* (prin segmentare), *oidiospori* (prin fragmentare), *aleuriospori* (se formează apical sau lateral pe sporofori scurți), *zoospori* (spori mobili), iar *aplanosporii* se formează prin septarea hifelor și sunt menținuți în interiorul unui înveliș. La *Azotobacter* se formează *chiști.*

Endosporul sau sporul endogen a fost considerat ca unic tip sporal bacterian, până la descrierea celorlalte tipuri. Are formă sferică sau ovalară. Cei ovalari au dimensiuni cuprinse între 0,5–1 μm, pentru axul scurt și 1,2–2 μm pentru axul lung.

Evidențiere. Endosporul este o structură refringentă și în celula vie, la microscopul optic apare strălucitor. Datorită învelișurilor groase, greu penetrabile pentru coloranți (în special cortexul) și datorită conținutului lor chimic particular, sporul se colorează prin tehnici speciale.

Poziția sporului în celulă poate fi terminală, subterminală sau centrală. Sporii pot fi *deformanți* (diametrul lor este mai mare decât al celulei) și *nedeformanți* (diametrul este mai mic decât al celulei).

Într-o celulă bacteriană sporulantă, sporul este unic, cu rare excepții: în sol apar bacterii *bisporulate*, iar în intestinul unor vertebrate aquatice, s-au evidențiat bacterii *polisporulate*. Probabil că

BCU "ION CREANGĂ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sporii multipli apar ca rezultat al perturbării mecanismului de separare a celulelor după diviziune. Ei se formează în celulele în care materialul nuclear s-a replicat, dar nu s-a format septul de diviziune.

Sporogeneza este declanşată în mod obişnuit de lipsa unui nutrient esenţial în mediu (sursa de azot sau de carbon). Procesul este foarte complex din punct de vedere genetic, biochimic, structural şi funcţional.

Sporularea implică activarea unui număr de peste *50 de gene* sporale, inactive în celula vegetativă (Errington, 1993). Sub aspect *biochimic*, sporularea este însoţită de modificări majore ale componentelor moleculare. Se sintetizează un set de *proteaze* care măresc turnover-ul proteic, furnizând aminoacizii necesari sintezei proteinelor noi.

Din punct de vedere *structural*, la nivel electrono-optic, sporularea la *B. subtilis* parcurge 7 stadii (numerotare introdusă de Ryter, cu cifre romane – I–VII), în cursul cărora celula sporală se formează şi se eliberează (fig. 20).

Celula vegetativă în care nu se detectează modificări structurale legate de sporulare a fost desemnată cu *stadiul 0*. Sporularea este precedată de *replicarea* materialului nuclear. Cei doi cromosomi fuzionează, formând o *structură axială* alungită, unică (stadiul I). Nucleoidul axial diploid *segregă* în două structuri cromosomale: una migrează spre polul sporal şi va deveni *nucleoidul sporului*, iar cealaltă rămâne în celula vegetativă. Celula se divide asimetric, subpolar prin formarea *septului sporal* şi se formează două celule inegale.

Diviziunea pentru sporulare se aseamănă cu cea vegetativă, dar se deosebeşte prin expresia genică diferită. Diviziunea pentru sporulare, fiind asimetrică, necesită relocalizarea aparatului de diviziune celulară. Asimetria morfologică a celor două celule duce la evoluţii ulterioare diferite.

Diviziunea vegetativă şi cea de sporulare se deosebesc prin mai multe caracteristici:

- septul de diviziune pentru sporulare este mai subţire decât septul diviziunii vegetative;
- cele două celule rezultate nu se separă, iar celula mamă înglobează presporul;
- autoliza peptidoglicanului din septul de diviziune începe la centrul septului şi progresează până la liza completă a materialului septal. În contrast, autoliza materialului parietal al septului diviziunii vegetative începe la periferia septului şi progresează spre centru, dar nu e completă, deoarece septul va forma peretele polar al celor două celule rezultate din diviziune;
- după diviziunea de sporulare, în cele două celule se iniţiază programe diferite de expresie genică, controlate de factorii σ care orientează legarea ARN-polimerazei de promotori diferiţi.

Septul sporal se iniţiază sub forma a două mici intruzii simetrice ale peretelui mureinic, spre interiorul celulei. Formarea completă a septului corespunde *stadiului II*.

În timpul diviziunii asimetrice, numai 1/3 din cromosom este prezent în structura presporală. Restul de 2/3 este pompat rapid de o *translocază*, rezultând două celule inegale, dar cu genomuri identice. După diviziunea asimetrică, presporul şi celula vegetativă sunt celule adiacente, complet separate.

În *stadiul al III-lea*, septul polar se subţiază şi se lizează din zona centrală spre periferie. Membrana citoplasmatică, după ce îşi pierde punctele de legătură cu septul, începe să se plieze şi acoperă progresiv suprafaţa sporului. Când plierea este completă, cele două pliuri membranare fuzionează la polul celulei şi celula sporală este complet înglobată în celula vegetativă.

În spaţiul dintre cele două membrane care înconjură *presporul* se depun cele două straturi de peptidoglican: *peretele celular primordial şi cortexul* (*stadiul IV*).

Stadiul V corespunde depunerii unei structuri proteice complexe pe suprafaţa externă a presporului, formată din două lame: *învelişul sporal intern* (intina) şi *învelişul sporal extern* (exina). *Stadiul VI* corespunde maturării sporului şi *dobândirii rezistenţei la căldură şi la radiaţiile UV*, iar *stadiul VII* corespunde *lizei celulei* şi eliberării sporului matur.

Schimbările morfologice profunde care se produc în timpul sporulării sunt cuplate cu modificarea expresiei genelor, datorită activării în cascadă a *factorilor σ*, care modifică specificitatea de legare a ARN-polimerazei, de promotorii diferitelor gene.

S-au izolat mutante bacteriene care blochează sporogeneza în diferite etape.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.7.1. Structura internă a endosporului

La diferite grupe de bacterii există variaţii importante ale structurii sporului, în special în privinţa învelişurilor, care diferă prin numărul şi grosimea lor. Există de asemenea variaţii cu privire la relaţia sporului cu celula vegetativă în care s-a format: sporul rămâne inclus în celulă sau se eliberează curând după formare, prin liza acesteia.

Sporul este alcătuit din *protoplastul sporal*, care conţine *sporoplasma* şi *materialul nuclear*. Protoplastul sporal este acoperit de următoarele structuri:

- *un perete intern* subţire, originar din membrana internă a presporului. După germinare, acesta va forma peretele celulei vegetative;
- *cortexul sporal,* cu grosime variabilă, electronoclar. Este o structură multilaminară ce se formează pe feţele adiacente ale celor două membrane ale presporului şi constă, în general, din peptidoglican şi un lactam muramic specific sporului;
- *stratul extern* al cortexului, derivat din membrana externă a presporului;
- *învelişul sporal intern (intina)*, un strat dens, de natură proteică;
- *învelişul sporal extern (exina)*. Uneori, aceste două învelişuri sunt pluristratificate;
- *exosporul,* este constituit dintr-un rest al celulei vegetative, adiacent celorlalte învelişuri sporale, prin intermediul filamentelor "suspensoare".

Învelişurile sporale cuprind o fracţie majoră a sporului. Aceste structuri sunt de natură proteică, cu o fracţie de polipeptide acide solubile în baze, în învelişul intern şi o fracţie rezistentă la baze, datorată legăturilor S-S.

La unele categorii de spori se găsesc structuri suplimentare denumite *apendice sporale*. Semnificaţia lor funcţională nu este certă, dar ar putea fi implicate în dispersarea sporilor în natură sau ar facilita absorbţia substanţelor nutritive în perioada premergătoare germinării sporului.

2.7.2. Particularităţile biochimice ale sporului

Sporularea este iniţiată ca răspuns la numeroase semnale externe şi interne: epuizarea unui nutrient, densitatea celulară. Sporularea eficientă necesită o densitate celulară mare. Scăderea amplă a concentraţiei GTP şi GDP se corelează cu declanşarea sporulării. Schimbarea specificităţii ARN-polimerazei este foarte importantă pentru controlul sporulării la *B. subtilis*. Când începe sporularea, multe gene active în celula vegetativă sunt represate şi sunt activate genele specifice. Fiecare stadiu al sporulării este marcat de schimbarea expresiei unor gene, mediată de *factorul* σ, care schimbă specificitatea legării de promotor a ARN-polimerazei.

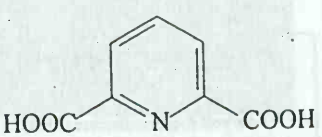
Protoplastul sporal conţine toate categoriile de molecule necesare reluării creşterii: materialul nuclear şi cantităţi mici ale fiecărui component al aparatului de sinteză proteică (ribosomi, ARNt, enzime). Lipsesc componentele celulare instabile (ARNm şi nucleozid-trifosfaţii), dar sunt prezenţi precursorii lor mai stabili (nucleozid mono- şi difosfaţi). Aminoacizii şi enzimele lor de biosinteză sunt virtual absente, dar la germinare, ambele tipuri vor fi generate prin hidroliza proteinelor de depozit, solubile, cu moleculă mică.

Puţine enzime sporale derivă din enzimele celulei vegetative prin clivare. Majoritatea enzimelor sporale *sunt noi*. Sinteza lor este codificată de gene activate în timpul sporulării.

Toate enzimele sporale sunt *termorezistente*, fapt explicabil prin dimensiunile lor mici, fiind reprezentate numai de situsul activ al moleculei. Lipsesc enzimele fundamentale ale metabolismului celular, ca si sistemele transportoare de electroni.

La cele mai multe bacterii, ionii de Ca lipsesc. În stadiile timpurii ale sporulării se activează sistemele de transport activ pentru Ca. Ionii de Ca sunt legaţi cu o cantitate echivalentă de *acid dipicolinic* (se formează din acidul diaminopimelic – un precursor al peptidoglicanului) şi formează *dipicolinatul*, care poate constitui circa 15% din greutatea uscată a sporului.

S-a considerat că sporul este rezultatul unui proces de deshidratare profundă. Cercetările ulterioare au evidenţiat că deosebirile dintre spor şi celula vegetativă nu sunt de ordin cantitativ, ci de ordin calitativ şi se referă la *starea apei*. În celula vegetativă, apa liberă reprezintă 70% din cantitatea totală, iar în spor oscilează între 3–10%,



Acidul dipicolinic

restul de 90–97% fiind *apa legată*. Din această cauză, sporul este lipsit de metabolism, sau are un metabolism de intensitate foarte mică, nedecelabilă. Celula sporală este vie, dar procesele vieții sunt *latente*. Fenomenul se numește *criptobioză* (viață ascunsă).

Consecința particularităților de compoziție chimică, la care se adaugă învelișurile groase multiple și pluristratificate, este rezistența deosebită a sporului la *căldură*, la acțiunea *substanțelor chimice* (antiseptice, dezinfectanți) și a *radiațiilor*. Rezistența termică este conferită de *dipicolinatul de Ca*. Mutațiile care reduc cantitatea de dipicolinat diminuă rezistența sporului la agentul termic.

Rezistența termică a sporului impune o metodologie costisitoare de sterilizare, la temperaturi foarte ridicate. Uneori, sporii rezistă la temperatura de 180°C, de la câteva minute, la câteva ore. Fierberea nu este o metodă de sterilizare, deoarece omoară numai formele vegetative, iar sporii rămân viabili.

Germinarea este procesul ireversibil în care sporul se activează de la starea latentă, la o stare metabolic activă, într-un interval scurt. *L-alanina* se leagă la un receptor specific pe suprafața învelișului sporal și inițiază germinarea, care decurge în trei stadii:

- *activarea* sporului prin deshidratare, asociată cu mărirea volumului;
- *germinarea*, adică modificarea localizată prin gelificare a învelișurilor sporale;
- *emergența* celulei vegetative din învelișuri, delimitată de un perete derivat din peretele sporal intern.

Într-un mediu nutritiv optim, germinarea este rapidă: de la inițiere până la diviziunea celulară, procesul durează 90 de minute. În medii favorabile, majoritatea sporilor germinează, dar o proporție mică rămân în stare latentă.

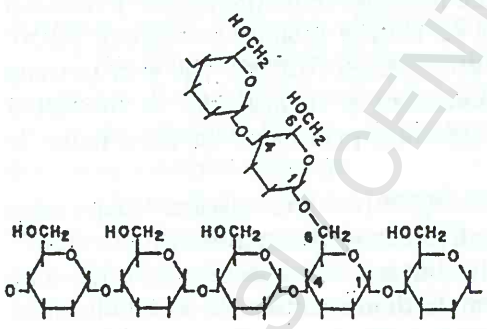
Pentru inițierea germinării, sporii necesită ca factori suplimentari: un compus cu grupări – SH și pH acid. După circa o oră de la începutul activării începe sinteza ADN.

2.8. Incluziile

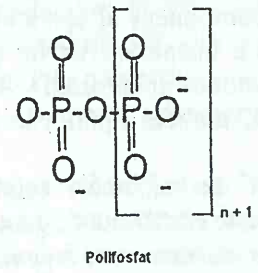
Incluziile sunt structuri inerte, ce apar în celula bacteriană la sfârșitul fazei de creștere logaritmică.

După compoziția chimică, incluziile sunt de 3 tipuri:

- *polimeri organici*: *polizaharidici* (amidon, glicogen), incluzii de *poli β-hidroxibutirat* (PHB) ce conțin lipide (2%) și proteine, *polimeri de natură proteică* (incluzia parasporală la *B. thuringiensis*) (fig. 19);
- *polimeri anorganici* (polimetafosfat, denumite incluzii de volutină);
- incluzii *anorganice simple* (de sulf coloidal, $CaCO_3$).

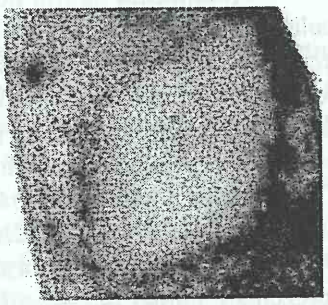


a

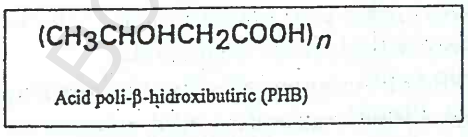


Polifosfat

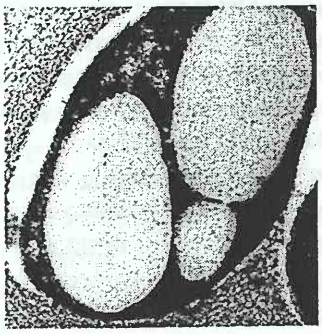
b



e



c



d

Fig. 19. Incluzii bacteriene. a. Formula structurală a glicogenului (molecule de glucoză legate ά -1,4, cu ramificații ά -1,6. b. Polifosfatul. c. Acidul poli-β-hidroxibutiric. d. Imaginea electrono-optică a celulei de *Azotobacter* cu incluzii de poli-β-hidroxibutirat. e. Imaginea electrono-optică a incluziei proteice parasporale la *B. thuringiensis* (original).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După criterii structurale se disting:

- incluzii *delimitate de membrane*, ce au ca prototip pe cele de poli-β-hidroxibutirat. Ca trăsătură distinctivă, ele relevă o structură lamelară concentrică, ce corespunde creşterii progresive a incluziei. Sinteza se face pe o cale laterală a sintezei acizilor graşi;
- incluzii lipsite de membrane (cele de glicogen, de sulf, incluzia proteică parasporală).

La microscopul optic, în celula vie, incluziile au aspect granular cu formă neregulată, refringente, cu dimensiuni de 50–100 nm.

Natura chimică a incluziilor se evidenţiază prin metode citochimice, cu coloranţi specifici. Incluziile de *amidon* (poliglucozid neramificat) se colorează în *albastru* cu soluţia Lugol, iar *glicogenul* (poliglucozid ramificat) se colorează în *brun*. Incluziile de PHB se colorează cu *negru de Sudan*, ca şi depozitele lipidice neutre ale celulei eucariote şi din această cauză au fost identificate incorect ca rezerve lipidice. Incluziile *proteice* se colorează cu *amido-schwarz*, iar cele de *polimetafosfat* sunt *metacromatice*, pentru că după colorare cu albastru de metilen, dobândesc culoarea roşie.

Ca regulă generală, o specie bacteriană formează un singur tip de depozit celular.

Granulele de *volutină* (polimetafosfat), denumite astfel pentru că s-au identificat la *Spirillum volutans*, sunt polimeri lineari de ortofosfaţi, de lungime variabilă. Se sintetizează în condiţiile deficitului oricărui nutrient major, prin adăugarea secvenţială a resturilor de fosfat la pirofasfat, după reacţia:

$$-P-P- + ATP \longrightarrow -P-P-P- + ADP$$

$$(-P-)n + ATP \longrightarrow (-P-)n+1 + ADP$$

Degradarea polifosfatului urmează reacţia inversă şi furnizează energie celulară sub formă de ATP.

Incluziile de *sulf anorganic* pot fi citoplasmatice sau sunt localizate la nivelul unor pliuri ale membranei plasmatice şi apar la două grupe fiziologice de bacterii:

- la cele sulfuroase purpurii (*Chromatiaceae*), care folosesc H_2S ca donor de electroni în procesul fotosintezei;
- la cele filamentoase *chimiolitotrofe* (*Beggiatoa, Thiotrix*), care oxidează H_2S şi eliberează energie. După epuizarea H_2S din mediu, sulful depozitat în celulă este oxidat la sulfat.

Semnificaţie biologică. Formarea incluziilor constituie o modalitate a celulei de a depozita cantităţi mari de materiale de rezervă. Ele se formează în condiţiile unui mediu bogat în substanţe nutritive, sau în cazul unui dezechilibru al compoziţiei chimice a mediului, în special al raportului C/N. Conţinutul incluziei este metabolizat după epuizarea resurselor energetice din mediu sau când raportul C/N revine la normal.

Stocarea moleculelor sub forma polimerilor este o modalitate de păstrare a echilibrului osmotic între celulă şi mediu, deoarece prin polimerizare moleculele devin inactive osmotic. Prin polimerizarea acidului PHB se evită acidifierea citoplasmei, consecutivă acumulării monomerilor. Grupările libere –COOH ale acidului PHB sunt anihilate prin formarea legăturilor esterice între monomeri.

Sinteza incluziilor proteice parasporale este sincronizată strâns cu iniţierea procesului de sporogeneză.

2.9. Glicocalixul

Glicocalixul este reprezentat de totalitatea structurilor polizaharidice extraparietale: *capsula*, cu diferite grade de dezvoltare şi *glicocalixul comportamental*.

2.9.1. Capsula

Capsula (fig. 20) este o structură accesorie, cu o consistenţă gelatinoasă, vâscoasă, care acoperă complet celula bacteriană. În funcţie de gradul de dezvoltare se disting următoarele structuri capsulare:

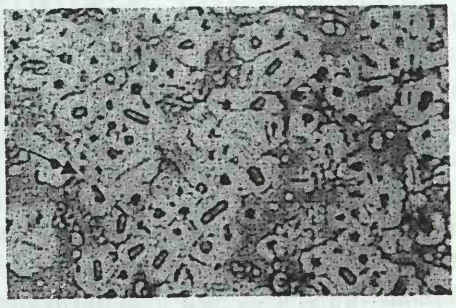


Fig. 20. Capsula bacteriană (colorație negativă, original).

- *microcapsula*, reprezentată de o peliculă fină de material polizaharidic, în jurul peretelui celular (până la 0,2 μm grosime). La microscopul optic se evidențiază numai prin metoda imunofluorescenței, dar este vizibilă la microscopul electronic;
- *macrocapsula,* o structură omogenă, aderentă de celulă, mai groasă de 0,2 μm, vizibilă la microscopul optic prin tehnici speciale de colorare negativă. Dacă are o structură laxă și flexibilă, coloranții o penetrează. Aderența macrocapsulei de celulă este fermă și prin centrifugare se depune concomitent cu celulele;
- *stratul mucos* este o structură capsulară cu o grosime neuniformă și distribuție dezordonată în jurul celulei. Consistența este mai fluidă, iar prin centrifugare, celulele se desprind și se depun, iar materialul polizaharidic ramâne în suspensie;
- *zoogleea* – o masă de material polizaharidic, în care sunt cuprinse un număr mare de celule bacteriene.

Materialul capsular se găsește la bacteriile Gram pozitive și Gram negative din sol, ape (dulci și sărate), rumen, la bacteriile patogene ce produc infecții urinare și pulmonare.

2.9.1.1. Natura chimică a materialului capsular

Materialul capsular este de natură *polizaharidică*. De cele mai multe ori, în alcătuirea sa se găsesc D-glucoza, D-fructoza, D-galactoza. Mai rare sunt manoza, fucoza, pentozele. Unele polizaharide extracelulare se aseamănă cu acizii teichoici deoarece conțin glicerol-fosfat sau ribitol-fosfat.

Materialul capsular poate fi un *homopolizaharid* sau un *heteropolizaharid.* Cele mai cunoscute *homopolizaharide* sunt *dextranii* și *levanii.*

Dextranii formează o clasă mare de polizaharide, alcătuiți din unități de D-glucopiranozil, legate α 1–6, cu punți de ramificare în pozițiile 2, 3 sau 4. Lungimea lanțului este cuprinsă între 40–500 resturi de glucoză. Dextranii sunt produși de *Peptococcus (Leuconostoc) mesenteroides,* din sucroză. Sinteza lor este abundentă în melasa de la fabricile de zahăr, unde o cantitate semnificativă de zahăr este convertită la dextran, aducând prejudicii economice importante.

În stare purificată, *dextranul* se folosește în practica transfuziilor, ca înlocuitor al plasmei, fiind solubil în apă, iar *sephadexul* este un dextran folosit în cromatografia bazată pe principiul sitei moleculare.

Levanii sunt poli-D-fructani (fructozizi), sintetizați de unele bacterii patogene pentru plante (*Pseudomonas sp., Xanthomonas sp.),* de *Streptococcus salivarius*, de *Bacillus sp.* Au greutăți moleculare de 1000 kDa sau mai mult.

Heteropolizaharidele sunt alcătuite dintr-un număr variat de unități repetitive alcătuite din monomeri diferiți: glucoză, fructoză, galactoză, manoză, acid galacturonic, derivați aminați și acetilați ai acestora.

Structura biochimică a heteropolizaharidelor este foarte diferită nu numai în funcție de compoziția chimică globală, ci și de secvența diferiților monomeri în catena polizaharidică (de exemplu, pentru xantan, structura repetitivă este un pentazaharid).

Diversitatea monomerilor glucidici conferă heteropolizaharidelor o anumită diversitate a structurii chimice și în consecință, o anumită specificitate antigenică. De exemplu, la *Str. pneumoniae* există peste 80 de tipuri chimice diferite de material capsular, care corespund nu numai unor diferențe de compoziție chimică, dar și de secvență a monomerilor. Varianta antigenică a polizaharidului capsular imprimă specificitatea anticorpilor în reacțiile de apărare față de diferitele tulpini patogene ale acestei bacterii.

La bacteriile care au informația codificatoare, sinteza materialului capsular este modulată cantitativ de compoziția mediului de creștere. De exemplu, *Peptococcus mesenteroides* sintetizează dextrani numai dacă crește pe mediul cu sucroză. Celulele de *Azotobacter*, cultivate pe un mediu cu N combinat nu sintetizează material polizaharidic, dar pe un mediu fără N combinat, produc un strat mucos abundent, cu caracter adaptativ care limitează difuzia O_2 în celule, protejând astfel *nitrogenaza*, sensibilă la prezența O_2.

Bacteriile enterice sintetizează polizaharide în condițiile unui exces de glucide și ale limitării surselor de N, P, S, în mediul nutritiv.

Pe măsură ce cultura bacteriană care sintetizează polizaharide se dezvoltă, mediul lichid devine tot mai vâscos, datorită solubilității polimerilor în apă.

Unele bacterii sintetizează continuu exopolizaharide, în timpul fazei de creștere, iar altele, numai în faza logaritmică târzie și în faza staționară.

Capsula este o structură inertă, accesorie ce nu face parte integrantă din celula bacteriană. Cel mai adesea nu îndeplinește o funcție esențială pentru celulă.

Bacteriile patogene capsulate sunt virulente, deoarece capsula este un material *chimiotactic negativ* pentru fagocite. Pe mediul solidificat, ele produc colonii *netede* (S, *s*mooth). Mutantele lor necapsulate produc colonii *rugoase* (R, *r*ough) și sunt mult mai puțin virulente.

Materialul capsular este higroscopic (reține apa) și astfel protejează celula de desicație. Materialul capsular ar putea avea rolul de depozit al unor nutrienți din mediu.

Biosinteza celulozei. Unele bacterii sintetizează celuloza ca un produs exclusiv extracelular, care îndeplinește funcții fiziologice importante în mediile naturale: protecție mecanică, chimică și fiziologică la *Acetobacter xylinum* și *Sarcina ventriculi*; ușurează aderența în timpul interacțiunii simbiotice *Rhizobium*-plante leguminoase sau a interacțiunii infecțioase pentru speciile de *Agrobacterium.* Ipoteza actuală a biogenezei celulozei la plante și la bacterii consideră că, complexul membranar al celulozo-sintazei polimerizează resturile de glucoză (UDP-Glc) în lanțuri de glucani legați beta-1,4 și rezultă fibrile cristaline rigide, care sunt extruzate la suprafața celulei (Ross și colab., 1991). La *A. xylinum*, sintaza celulozei este alcătuită din cel puțin două subunități asemănătoare, dar distincte funcțional.

2.9.2. Glicocalixul comportamental

La anumite bacterii structurile superficiale sunt acoperite de un *glicocalix* adevărat, constituit dintr-o rețea de filamente polizaharidice și glicoproteice, legate de LPS ale membranei externe la bacteriile Gram negative (fig. 21) sau de mureina celor Gram pozitive. Filamentele formează o structură *pericelulară* dezordonată, ca o pâslă, prin intermediul căreia celula se ancorează fie pe alte celule, fie pe suporturi inerte.

Glicocalixul se găsește numai la bacteriile care trăiesc în *mediile naturale*, având un caracter *adaptativ*, adică există numai în condițiile în care prezența ei conferă celulei un avantaj selectiv. După cultivare în medii artificiale (bulion, geloza), glicocalixul dispare și din această cauză s-a evidențiat târziu. Deoarece nu persistă la celulele cultivate în mediile artificiale, s-a propus denumirea de *glicocalix comportamental.*

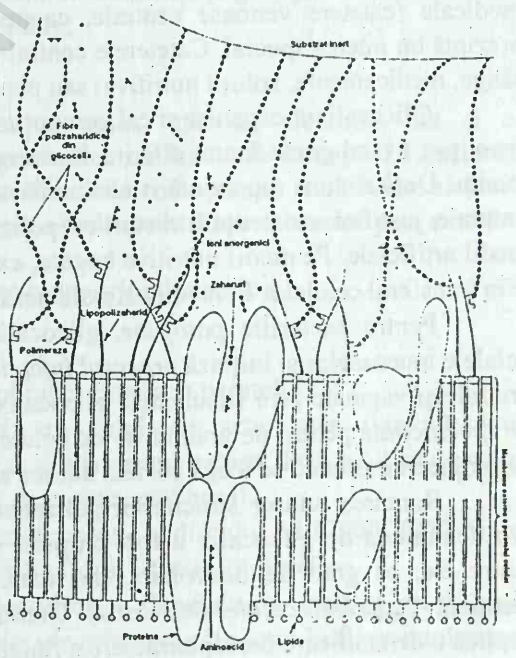


Fig. 21. Reprezentarea schematică a glicocalixului legat de membrana externă a unei bacterii Gram negative (după Costerton, 1978).

Glicocalixul a fost studiat la celulele bacteriene din *placa dentară.* Placa este un depozit de culoare alb-gălbuie, vizibil cu o lupă, ce se formează pe suprafața smaltului dentar, inițiată de *Str. mutans.* Celulele sale sintetizează un polizaharid glucanic și acizi lipoteichoici, prin intermediul cărora aderă foarte strâns de suprafața smaltului, formând inițial o microcolonie, iar ulterior, o colonie. Celulele aderă între ele, dar și de smaltul dentar (hidroxil-apatita), prin glicocalix. După impregnare cu săruri și glicoproteine salivare se creează un micromediu anaerob, în care bacteriile elimină produsele de catabolism. Micromediul coloniei se acidifică și se creează condițiile favorabile degradării smaltului. În prezența sucrozei, la pH acid, sinteza ALT este stimulată semnificativ. Astfel se inițiază formarea cariei.

În mediul aquatic, celulele bacteriene lipsite de structură capsulară se asociază, formând *biofilme**. Celulele se ancorează de suport, prin intermediul glicocalixului, formând un consorțiu funcțional. *Biofilmul se definește ca un ansamblu format din celule și din produse extracelulare prin intermediul cărora se ancorează de suportul viu sau inert, formând asociații.* În biofilm, celulele bacteriene au un fenotip modificat în ceea ce privește rata de creștere și de transcriere a genelor. Legarea (aderența) celulelor de suport este prima etapă a procesului de colonizare. Astfel se inițiază formarea coloniei bacteriene.

*Majoritatea microorganismelor din mediile aquatice nu se găsesc ca organisme libere plutitoare, ci trăiesc atașate de suprafețe, inclusiv la suprafața apei, unde formează un *biofilm*. În matricea unui biofilm, asociațiile naturale de bacterii funcționează ca un consorțiu cooperant. Biofilmele reprezintă sisteme biologice cu un nivel înalt de organizare, în care comunitățile de bacterii sunt coordonate funcțional.

În mediile naturale, glicocalixul este structura care mediază asocierile bacteriene *polispecifice*. Astfel, în rumen, se formează asociații coloniale *polispecifice* (colonii polibacteriene). Între ele se stabilesc *relații metabolice sinergice,* prin care bacteriile realizează activități metabolice, pe care speciile separate nu le pot desfășura. De exemplu, în rumen se sintetizează CH_4: unele bacterii produc H_2, altele CO_2, iar bacteriile metanogene reduc CO_2, utilizând H_2 ca sursă reducătoare.

Capacitatea lor de a popula întreaga biosferă se datorează *versatilității* lor metabolice și *plasticității fenotipice*. Teoria plasticității fenotipice consideră că bacteriile răspund modificărilor mediului de viață prin schimbări structurale și funcționale (metabolice) profunde, *în cadrul aceleiași norme genetice.*

Prin intermediul biofilmului, celulele bacteriene se atașează de suport și se agregă, amplificând interacțiunile celulare. Prin atașare, bacteriile dobândesc avantajul *versatilității fenotipice.*

Biofilmele formate *in situ* de bacteriile patogene sau potențial patogene pe dispozitivele medicale (catetere venoase centrale, catetere urinare, lentile de contact, dispozitive intrauterine) prezintă un interes special. Cateterele centrale se montează pentru administrarea fluidelor (produse din sânge, medicamente, soluții nutritive) sau pentru monitorizarea hemodinamicii.

Glicocalixul capsular și cel comportamental sunt structuri foarte variabile din punct de vedere fenotipic, având grade foarte diferite de dezvoltare la aceeași tulpină bacteriană, în diferite condiții de mediu. Deși sinteza reprezintă o cheltuială semnificativă de energie, rolul lor funcțional în mediile naturale justifică existența structurilor polizaharidice. Glicocalixul dispare la celulele cultivate în medii artificiale. Pe medii nutritive bogate, existența acestor structuri nu mai este necesară, dar reapar prin transferul celulelor în medii naturale nefavorabile.

Pentru bacteriile *patogene*, glicocalixul este structura prin care celulele se ancorează de celulele mucoaselor și inițiază *procesul infecțios*. De exemplu, *Neisseria gonorrhoeae* aderă la celulele uretrale și vaginale prin filamentele glicocalixului. Uneori, legarea mediată de glicocalix are caracter de *specificitate* pentru un anumit tip de celule ale gazdei (de exemplu, bacteriile care inițiază procese patologice intestinale se leagă cel mai adesea exclusiv de epiteliul intestinal).

Reunirea tuturor structurilor polizaharidice extraparietale, indiferent de gradul de dezvoltare sub denumirea de glicocalix a fost propusă de Costerton (1982). Capsula este cea mai importantă dintre ele, ca grad de dezvoltare, dar toate structurile polizaharidice îndeplinesc aceiași funcție esențială – *aderența celulei* de substrat. Gradul diferit de dezvoltare, de la glicocalix la macrocapsulă implică o diversificare corespunzătoare a funcțiilor acestor structuri.

Prin gradul lor foarte diferit de dezvoltare în raport cu condițiile de mediu, structurile polizaharidice extraparietale sunt expresia autentică a *plasticității fenotipice* structurale a bacteriilor.

Plasticitatea fenotipică a bacteriilor permite *adaptarea rapidă* la schimbări majore ale mediului. Bacteriile sunt primele organisme care se adaptează la condițiile noi de mediu, în timp ce organismele superioare se adaptează mult mai lent, prin *selecția mutantelor.*

Bacteriile colonizează ecosistemele noi și prin mecanismul genetic al *selecției mutantelor.* Această dublă capacitate adaptativă – prin plasticitate fenotipică și prin selecția mutantelor – explică uriașul succes al bacteriilor de a popula chiar și cele mai ostile medii.

2.10. Flagelul

Flagelul (*flagelum* = bici) este organitul extracelular al mobilității celulei procariote. Organitele omologe de mobilitate ale celulei eucariote sunt *flagelii* și *cilii.* Flagelii se mai numesc și *undulipode* (*undula* = undă mică; *pus, podos* = picior).

Flagelul bacterian se prezintă ca un filament extracelular, filiform, ondulat, cu grosimea uniformă pe toată lungimea sa. Lungimea este variabilă, de la 4–5 μm până la 70 μm, iar diametrul este de 20 nm.

Flagelii nu se observă prin examinarea directă a celulelor la microscopul optic. Existența lor se deduce indirect, din mobilitatea celulelor bacteriene pe preparatele din cultura vie. Celulele fără flageli se numesc *atrihe.* După numărul și modul de așezare a flagelilor, bacteriile sunt (fig. 22):

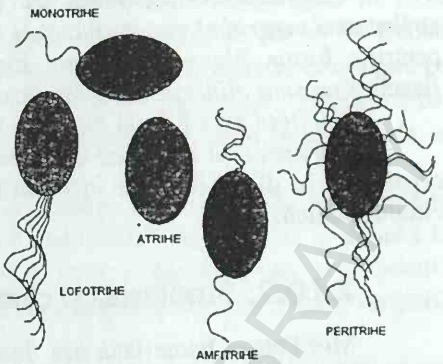


Fig. 22. Reprezentarea schematică a modului de așezare a flagelilor unei celule bacteriene. Bacteriile fără flageli se numesc atrihe.

- monotrihe (cu un singur flagel);
- amfitrihe (cu doi flageli așezați la cei doi poli ai unui bacil);
- lofotrihe (cu mai mulți flageli la unul dintre poli);
- peritrihe (cu mai mulți flageli dispuși pericelular).

Poziția flagelului (sau flagelilor) poate fi polară, subpolară sau ecuatorială.

2.10.1. Structura flagelului

Comparativ cu flagelul celulei eucariote, flagelul bacterian are o structură simplă, cu originea în structurile de înveliș ale celulei și este alcătuit din următoarele elemente (fig. 23):

- *corpusculul bazal*, localizat în învelișurile celulare;
- *cârligul*;
- *filamentul extern* (flagelul propriu-zis).

Corpusculul bazal formează o structură rotativă unică, atât ca alcătuire, cât și ca funcționalitate în sistemele biologice, asemănătoare în general cu un buton de cămașă. La bacteriile Gram negative, structura sa este mai complexă, deoarece discurile componente sunt duble, alcătuite din proteine diferite și îndeplinesc funcții diferite. Se disting următoarele discuri, așezate pe o structură axială, fină: - -

- discul M (mobil) este ancorat în structura membranei citoplasmatice;
- discul S (stator) este legat de peptidoglican;
- discul P este localizat în spațiul periplasmic;
- discul L este legat de lipopolizaharidele membranei externe a peretelui.

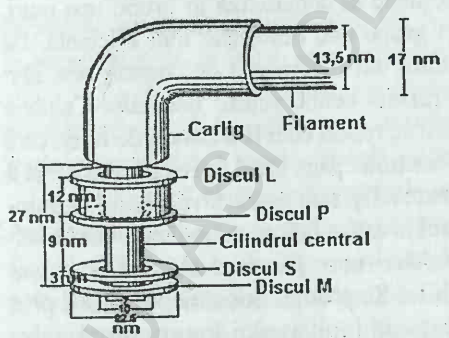


Fig. 23. Reprezentarea schematică a 'motorului' rotativ al flagelului de *E. coli.* 'Rotorul' este un disc proteic integrat în membrana plasmatică și se rotește cu circa 100 revoluții/secundă, față de discul stator, sursa de energie fiind gradientul de protoni (după Todar, 2004).

Cârligul are rolul de articulație flexibilă între corpusculul bazal și filamentul extern. Prin axul său central, cârligul se leagă de corpusculul bazal.

Mișcarea de rotație a discului M (3000–4000 r/min) este transmisă cârligului și filamentului extern.

În alcătuirea flagelului intră cel puțin *11 tipuri de molecule proteice*: câte unul în filamentul extern și cârlig și cel puțin 9 tipuri de proteine în corpusculul bazal. Cea mai cunoscută este proteina filamentului extern, denumită *flagelină* (gr. mol. 40 kDa). Moleculele sale sunt așezate după o simetrie *helicală*, formând o structură tubulară, canaliculară. Moleculele de flagelină au proprietatea de *autoasamblare*: dacă moleculele de flagelină sunt dispersate, în condiții adecvate ele se reasamblează spontan.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Flagelina se sintetizează sub forma monomerilor, în interiorul celulei. Moleculele de flagelină străbat *axul central* al structurii bazale şi se aşează la *capătul distal* al flagelului, după o simetrie helicală, pentru a forma filamentul extern. Flagelul bacterian creşte prin regiunea sa apicală. Moleculele de flagelină *nu sunt eliberate* în mediul extracelular înainte de a fi asamblate în structura flagelului.

Cârligul este format din subunităţi proteice identice. Funcţia sa nu este cunoscută.

Corpusculul bazal are o structură moleculară mult mai complexă. Cele 9 proteine diferite sunt organizate în discurile care înconjură un ax subţire, ce se inseră structurii flagelului,în membrana citoplasmatică.

2.10.2. Motilitatea şi chimiotaxia

Motilitatea bacteriană are două particularităţi: este foarte *rapidă* şi se face după o direcţie *aleatorie*. Motilitatea a fost studiată cu ajutorul unui microscop special (microscop de urmărire) la o mutantă monoflagelară de *E. coli*.

Cercetările de reologie* au arătat că în mediul nutritiv lichid (bulion), celula bacterină întâmpină o rezistenţă foarte mare, pe care o depăşeşte. Explicaţia rezidă în metabolismul foarte intens al celulei bacteriene şi în natura particulară a sursei de energie utilizată. Pentru mobilitate, celula bacteriană nu utilizează ATP, ci *energia electrochimică*, adică fluxul de electroni care străbate regiunea bazală a motorului rotativ. Energia de rotaţie a structurii bazale este energia protonică (chemiosmotică) generată de deplasarea protonilor prin membrana celulară, care furnizează forţa inegalabilă de deplasare a celulei bacteriene.

* Reologia studiază forţele de frecare care se opun deplasării corpurilor solide în mediile lichide, în funcţie de vâscozitatea acestora.

Celulele de *Proteus* (la origine, termenul se referea la zeul grec al mării, care ia multiple înfăţişări pentru a se face nevăzut) se deplasează pe suprafaţa mediului solidificat prin *roire* (*swarming*). Roirea se produce pe o suprafaţă solidă care nu permite mişcarea flagelară obişnuită în mediul lichid. Studiile de roire pe agar încep prin uscarea suprafeţei agarului pentru a îndepărta umiditatea. Astfel este împiedicată migrarea prin deplasarea în mediul lichid.

Procesul roirii cuprinde următoarele evenimente: a) *creşterea celulelor roitoare*; b) *migrarea lor pe suprafaţa agarului*; c) *diviziunea lor în celule scurte*.

Comportamentul cunoscut sub denumirea de *roire* poate fi descris ca o mişcare a celulelor alungite şi flagelate pe suprafaţa mediului solid, în cicluri periodice de mişcare şi consolidare. Celulele care roiesc suferă importante modificări morfologice. Roirea este determinată de apariţia celulelor filamentoase (20–80 μm lungime), cu un număr mare de flageli (500–1000 flageli/celulă), denumite *celule roitoare*. În timpul consolidării, celulele roitoare se divid pentru a produce celule scurte (2–4 μm lungime, cu 1–10 flageli) care cresc şi se divid o perioadă de timp, apoi se diferenţiază pentru a forma o altă generaţie de celule roitoare. Celulele roitoare apar la periferia coloniei, pe suprafaţa liberă, în grupe mici, care se deplasează pe o distanţă scurtă şi se întorc din nou la colonie. Pe măsură ce perioada de roire creşte, celulele se deplasează în grupe mai mari, tot mai departe de colonie, înainte de a se reîntoarce. Deplasarea în grupe mai mari este mai eficientă. La terminarea primei perioade de roire, mişcarea se opreşte şi celulele intră într-o perioadă de consolidare. Din celulele filamentoase, prin diviziune transversală în câteva puncte rezultă celule scurte normale. Celulele scurte rezultate prin diviziunea celulelor roitoare cresc şi se divid şi ciclul se repetă cu a II-a bandă de roire, care începe de la marginea primei benzi. Fenomenul se numeşte *zonare* şi continuă până când întreaga supra-faţă a plăcii este acoperită de câteva benzi concentrice de creştere densă şi laxă. Mişcarea poate fi rezultatul chimiotaxiei negative faţă de cataboliţii care se acumulează, sau al chimiotaxiei pozitive faţă de substanţele nutritive.

La spirochete, mişcarea este rezultatul contracţiei şi relaxării unui *fascicul de fibrile axiale* (axostil), situate între corpul celulei şi o membrană ce acoperă celula. Se produc mişcări pulsatorii prin flexia şi extensia celulei, precum şi o mişcare concomitentă de rotaţie în jurul axului longitudinal.

2.11. Fimbriile

Fimbriile sunt structuri de tipul unor apendice filamentoase, rigide sau flexibile şi neuniforme ca lungime, care se extind de la suprafaţa celulei bacteriene.

Termenul de fimbrii a fost introdus de Duguid (1955) (lat. = *fibra, franjuri*), iar în 1959 Brinton a folosit termenul de pil (lat. *pilus* = păr). Apoi s-a sugerat ca termenul de pil să fie folosit pentru structurile filamentoase codificate de plasmidele conjugative, cu rol în procesul de conjugare ce constă în transferul unui fragment de ADN de la o celulă donor la o celulă receptoare. Adeseori, cei doi termeni se folosesc pentru a descrie aceiaşi structură. Fac excepţie structurile fimbriale de la *Neisseria*, pentru care literatura foloseşte termenul de pil.

Fimbriile sunt alcătuite din molecule proteice de *fimbrilină*, cu gr. mol. de 15–30 kDa, aşezate totdeauna după o simetrie helicală. După sinteză, fimbrilina este transferată extracelular şi depusă *la baza fimbriei*. Numărul lor este de până la 1000/celulă. Dacă sunt numeroase, au o dispoziţie *pericelulară*. Dacă sunt puţine, au localizare *polară* sau *bipolară*. Lungimea lor este foarte variabilă (1–20 μm), ceea ce sugerează că au vârste diferite.

Fimbriile se observă la microscopul electronic, după *coloraţia negativă* a celulelor întregi sau se evidenţiază indirect prin capacitatea lor de a *aglutina* hematiile diferitelor specii de animale şi pot fi împărţite în 3 categorii *structurale*:

- fimbrii *rigide*, cu diametrul de 5–10 μm, cu un lumen de circa 2 nm (la enterobacterii). Regiunea hidrofobă este la capătul COOH al fimbrilinei;
- fimbrii *flexibile*, cu diametrul de 5–6 μm. Se mai numesc fimbrii N-metil-fenilalanină, deoarece la capătul N-terminal al fimbrilinei au un rest de fenilalanină metilată. Se găsesc la *Ps. aeruginosa, N. gonorrhoeae, N. meningitidis*. Regiunea N-terminală este hidrofobă;
- fimbrii *flexibile subţiri spiralate*, cu diametrul de 4 μm sau mai puţin, fără lumen (K_{88}, K_{99}, la *E. coli*).

Unele fimbrii au atât o regiune rigidă, cât şi una flexibilă.

Fimbriile sunt comune la bacteriile *Gram negative* şi mai rare la bacteriile Gram pozitive (*Corynebacterium, Actinomyces)*, dar sunt diferite structural.

O bacterie posedă câteva tipuri de fimbrii, în funcţie de grosime, lungime, specificitatea antigenică (determinată de secvenţa aminoacizilor în molecula de fimbrilină) şi de specificitatea receptorilor glicoproteici ai celulelor epiteliale de care aderă.

Cea mai importantă *funcţie* care li se atribuie ar fi aceea de *punţi de aderenţă intercelulară* sau aderenţă de suportul inert. La bacteriile din mediile aquatice, fimbriile favorizează asocierea celulelor şi astfel se formează pelicule fine (filme) de *neuston* la suprafaţa apei, cu rol adaptativ, ce asigură condiţii bune de aerare pentru bacteriile aerobe şi de luminozitate pentru cele fotosintetizante.

Pentru bacteriile patogene, prezenţa fimbriilor (tulpinile *fim*$^-$) le conferă un grad superior de virulenţă, deoarece fimbriile aderă ferm la receptorii suprafeţei celulelor epiteliale ale mucoaselor şi ai hematiilor.

Receptorul major al suprafeţei celulelor eucariote pentru fimbriile bacteriene este o *glicoproteină cu manoză.*

În funcţie de comportamentul în prezenţa manozei, *in vitro,* s-au identificat *fimbrii manozo-sensibile* şi *manozo-rezistente*. La *E. coli* s-au evidenţiat fimbrii *manozo-sensibile* (manoza inhibă hemaglutinarea, *in vitro*, prin competiţia cu receptorii suprafeţei hematiilor).

Fimbriile *manozo-rezistente* aglutinează numai eritrocitele tanate. Celulele bacteriene cu astfel de fimbrii aderă la celulele endoteliale, la celulele epiteliale ale tractului respirator, urogenital, la membrana bazală a tubilor renali, a capsulei Bowmann.

O celulă bacteriană exprimă simultan *fimbrii* cu specificităţi multiple de legare la suportul celular. Astfel se explică *selectivitatea* bacteriilor patogene şi comensale pentru anumite gazde şi ţesuturi.

Elaborarea conceptului adezinelor şi a specificităţii lor de legare explică *tropismul tisular selectiv* al bacteriilor infecţioase. Caracterul progresiv ascendent al infecţiei urinare, de la vezica urinară spre rinichi, împotriva fluxului urinar, se explică prin fenomenul de aderenţă, mediat de *fimbrii cu diferite specificităţi de legare*, de celulele epiteliale.

Exprimarea fimbriilor pe suprafaţa celulei este *adaptativă*. Ele favorizează aderenţa celulei bacteriene la substraturi celulare diferite.

Fimbrilina este codificată de *gene cromosomale*, ceea ce denotă că fimbriile au o importanţă ecologică deosebită, prezenţa lor fiind asociată cu anumite condiţii favorizante de mediu.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Orice linie bacteriană poate să existe alternativ în varianta *fim*⁻ sau *fim*⁻ şi să poarte simultan mai multe tipuri de fimbrii, cu specificităţi diferite de legare. Rata de mutaţie a genelor care codifică sinteza fimbriilor este foarte mare, astfel încât celulele *fim*+ trec în varianta *fim*- şi invers, prin retromutaţie.

Uneori fimbriile suferă fenomenul *variaţiei de fază şi al variaţiei antigenice*. Variaţia de *fază* înseamnă că o structură dată este sau nu produsă. Variaţia *antigenică* semnifică faptul că aceeaşi structură se produce în variante biochimice diferite.

Variaţia antigenică a fimbriilor bacteriene este rezultatul acţiunii mai multor mecanisme. Cel mai simplu este acumularea lentă a mutaţiilor punctiforme în gena codificatoare. Fenomenul se numeşte *drift antigenic* şi are loc atât la bacteriile patogene cât şi la cele nepatogene.

Semnificaţia biologică. Fimbriile sunt structuri din categoria *adezinelor*, care mediază interacţiunea celulă-suport. În ceea ce priveşte capacitatea de legare, cele mai multe adezine fac parte din familia *lectinelor**.

* Lectinele sunt glicoproteine care se leagă nespecific cu glucidele sau cu grupările glucidice ale glicoproteinelor. Ele precipită polizaharidele si glicoproteinele sau aglutinează celulele. Activitatea lor aglutinantă şi precipitantă poate fi inhibată de haptene (monozaharide şi oligozaharide).

2.12. Pilii

Pilii sunt apendice filamentoase neflagelare, a căror sinteză este codificată de gene localizate în structura unor plasmide denumite *conjugoni sau plasmide sex*.

Celulele purtătoare de pili au capacitatea potenţială de a dona material genetic (sunt celule "mascul"). Numărul pililor pentru o celulă este cuprins între 1 şi 10, iar lungimea este de circa 20 μm. Diametrul extern este de 6–15 nm, iar cel intern de 2,5 nm.

Pilii sunt alcătuiţi din molecule identice de *pilină*, o fosfoglicoproteină de 12–15 kDa. Se sintetizează în celulă, de unde este transferată în lumenul piliar şi este asamblată după o simetrie helicală, la extremitatea liberă a acestuia.

Pilii pot fi îndepărtaţi mecanic, prin agitare, dar se pot resintetiza. Prin încălzire sau tratament acid, pilii se dezagregă în moleculele componente (pilina). Restabilirea neutralităţii şi a nivelului termic permite *autoasamblarea* şi formarea unei structuri identice cu pilul original.

Rolul pililor. Prezenţa pililor este asociată totdeauna cu procesul de *conjugare* bacteriană. Pilii ar putea fi structuri esenţiale de transfer al materialului genetic de la celula donor la celula receptor. Molecula de ADN ar trece prin lumenul pilului.

După alţi autori, pilii ar avea numai rolul de a "agăţa" celula receptoare de material genetic, iar prin retracţia sa ulterioară, cele două celule s-ar apropia.

Rolul pililor în conjugare este argumentat de faptul că depilierea (prin agitare cu perle de sticlă) este însoţită de pierderea capacităţii de conjugare şi de restabilirea ei odată cu resinteza pililor.

Capacitatea de sinteză a pilinei se pierde odată cu pierderea plasmidei de sex şi este redobândită odată cu recâştigarea plasmidei.

Pilii poartă receptori de fagi. Pe suprafaţa pililor se găsesc receptori pentru fagii "ARN masculi". Se numesc fagi "masculi" deoarece infectează numai celulele cu potenţialitate de donor de material genetic. "Marcajul" cu fagii "ARN masculi" este modalitatea de a-i distinge de alte structuri filamentoase. La extremitatea liberă a pililor se găsesc receptori pentru fagii filamentoşi.

2.13. Dinamica (evoluţia) unei culturi bacteriene

Cultura bacteriană este rezultatul creşterii şi multiplicării într-un mediu lichid sau solid, a unei mici cantităţi iniţiale de celule, care constituie *inoculul*.

Microorganismele se cultivă în mai multe scopuri:

- izolarea si identificarea lor;
- menţinerea viabilităţii lor în colecţie;
- studiul sensibilităţii la antibiotice în laboratorul clinic sau în scopul cercetării;

BUCHAREST MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY

– în scop industrial pentru obținerea *biomasei*, a unor produși de *biosinteză* sau de *fermentație*.

Există două modalități de cultivare a microorganismelor și tot atâtea tipuri de culturi:

– culturile bacteriene *discontinue* se obțin prin cultivarea în mediul nutritiv lichid sau solidificat, ce nu se reînnoiește;
– culturile bacteriene *continue* se obțin prin cultivarea în mediu lichid reînnoit permanent, cu o anumită rată.

În mod curent, în laborator se obțin culturi bacteriene *discontinue*, într-un volum fix de mediu lichid sau solidificat, nereînnoit. Odată cu creșterea culturii bacteriene, compoziția chimică a mediului se modifică: scade cantitatea de substanțe nutritive și se acumulează cataboliți, care pot fi toxici.

Într-o cultură discontinuă, numărul de celule viabile variază continuu. Ritmul de diviziune este condiționat de concentrația nutrienților: este foarte înalt în faza inițială a evoluției culturii, când mediul oferă condiții optime, dar se diminuează treptat, până la 0, pe măsura epuizării nutrienților și a acumulării cataboliților.

Într-o cultură discontinuă, ciclul celular este *sincron* numai în primele cicluri de diviziune celulară Curând apar decalaje și ritmul diviziunii devine *asincron*. Diferite grupe de celule se găsesc în faze diferite ale ciclului de creștere și multiplicare. Vârsta celulelor unei culturi discontinui este diferită. Numărul de generații celulare este limitat.

Analiza evoluției numărului de celule într-o cultură discontinuă se poate face pe o curbă de creștere, trasată în coordonate semilogaritmice. *Panta* curbei reflectă valoarea ratei de creștere, variabilă în timp. *Curba* reflectă variațiile numărului de celule și implicit ale masei celulare, în funcție de timp.

În raport cu *variațiile ratei de creștere*, pe curbă se disting 6 momente:

I) *Faza de latență* (de lag sau de creștere 0) este greu de delimitat de faza următoare (fig. 24). Are o durată foarte variabilă: poate să fie foarte scurtă (chiar inexistentă) sau să dureze câteva ore. Numărul celulelor ramâne neschimbat, egal cu cel din inocul sau poate chiar să scadă ușor. Este caracterizată printr-o intensă activitate celulară. În cursul acestei faze, celulele se pregătesc pentru procesele de multiplicare care vor urma.

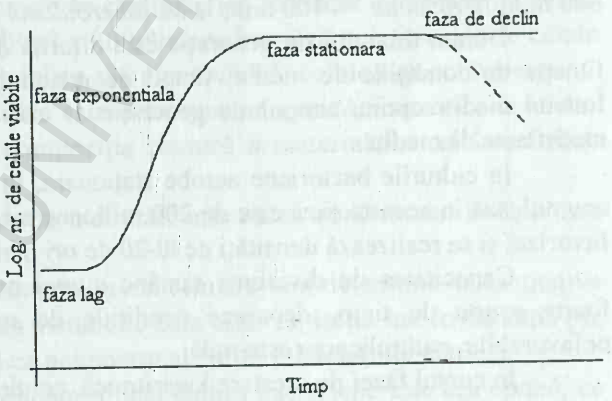


Fig. 24. Curba ideală de creștere a unei culturi staționare. Linia continuă reprezintă numărul total de celule, iar linia discontinuă ilustrează numărul celulelor viabile.

Timpul de latență este lung (1–3 ore) pentru inoculul bacterian care provine dintr-un mediu complex, ce conține numeroși compuși organici, însămânțat într-un *mediu sintetic minimal*. Latența corespunde timpului necesar sintezei enzimelor celulare pentru biosinteza metaboliților esențiali. Latența este de asemenea îndelungată, după inocularea unui mediu sintetic minimal, cu un număr mic de celule care provin din același mediu. În acest caz, bacteriile sunt adaptate fiziologic la mediul de creștere, dar creșterea întârzie, deoarece anumite componente toxice (de exemplu, ionii metalici) nu au fost neutralizate.

Timpul de latență depinde de starea fiziologică a celulelor din inocul: celulele aflate în faza staționară se adaptează ușor la un mediu diferit. Dacă inoculul provine dintr-o cultură aflată în faza de declin, alterarea proceselor fiziologice se reflectă în creșterea perioadei de latență. Timpul de latență nu influențează durata celorlalte faze de evoluție a unei culturi.

De cele mai multe ori, celulele bacteriene se adaptează la noile condiții de mediu datorită *plasticității fenotipice*, în cadrul aceleiași norme genetice. Uneori, adaptarea unei culturi la noile condiții de mediu se poate datora *selecției unei populații mutante* și timpul de lag este lung. În acest caz, în inocul se găsește o proporție foarte mică de celule *mutante*, capabile să metabolizeze aceste surse. Din punct de vedere genetic, mutantele sunt diferite de restul celulelor. Din această cauză, perioada de lag este foarte lungă. Masa celulară a culturii va deveni vizibilă numai după ce celulele mutante s-au multiplicat într-o măsură suficientă pentru a constitui o proporție semnificativă a

inoculului. În acest caz, perioada de lag este aparentă şi nu reală, deoarece celulele mutante capabile să crească se multiplică exponenţial cu mult înainte ca rezultatul multiplicării să se evidenţieze prin creşterea masei celulare.

Perioada de lag este *foarte scurtă* sau chiar absentă, dacă inoculul este transferat pe un mediu identic. Celulele posedă deja, echipamentul necesar metabolizării mediului respectiv.

2) *Faza de iniţiere a creşterii* este un interval scurt de timp, în care celulele bacteriene cresc şi se divid cu un ritm care creşte progresiv. Este faza de accelerare a ritmului de creştere.

3) *Faza de creştere exponenţială.* Creşterea numărului celulelor bacteriene se face cu o rată exponenţială (geometrică) constantă. Ritmul de diviziune este maxim. Mortalitatea celulară este practic nulă. După fiecare diviziune, numărul celulelor se dublează. Daca Xo este numărul de celule/ml la începutul fazei de creştere exponenţială, numărul de celule se dublează succesiv astfel:

- după o diviziune: $X_1 = 2 \times X_o$;
- după două diviziuni: $X_2 = 2^2 \times X_o$
- după n diviziuni: $X_n = 2^n \times X_0$.

Expresia se poate scrie: $\log X_n = \log X_o + n \log 2$.

Creşterea unei culturi bacteriene se realizează într-un interval de timp dependent de *timpul de generaţie* sau timpul de dublare a numărului de celule.

Timpul de generaţie este intervalul necesar pentru ca o celulă tânără rezultată din diviziune, să crească şi să se dividă şi se măsoară în intervalul de timp dintre două diviziuni.

La bacterii, timpul de generaţie se exprimă în minute sau ore: la *B. subtilis, B. megatherium* – 9–10 min; la *E. coli* – 20 min; la *Lactobacillus* – 100 min; la levuri – 60–120 min; la *Paramecium* – 600 min; la *Amoeba* – 1400 min; la *M. tuberculosis* – 1600 min; la *T. pallidum* – 2000 min.

Durata timpului de generaţie este diferită de la o specie la alta şi este controlată genetic. În funcţie de condiţiile de mediu, timpii de generaţie sunt diferiţi pentru aceeaşi tulpină bacteriană. Într-un mediu optim, timpul de generaţie al unei specii se scurtează, dar creşte mult în condiţii modificate de mediu.

În culturile bacteriene aerobe staţionare, în mediul lichid, numărul maxim de celule care se acumulează în această fază este de 200 milioane/ml. În condiţii de agitare, contactul cu nutrienţii este favorizat şi se realizează densităţi de 10-20 de ori mai mari.

Capacitatea de diviziune ramâne numai potenţială şi se realizează numai pentru intervale foarte scurte de timp, deoarece condiţiile de mediu devin foarte rapid limitante. În condiţii nefavorabile, multiplicarea este nulă.

În cursul fazei de creştere logaritmică, celulele prezintă câteva particularităţi: sunt uniforme ca mărime şi puţin mai mari faţă de dimensiunile tipice speciei respective. Se colorează omogen deoarece nu conţin incluzii şi sunt intens bazofile.

Într-o celulă care creşte, circa 80% din ARN total este ARN ribosomal, iar restul este reprezentat, în cea mai mare parte, de ARNt. ARNm, deşi îndeplineşte funcţia de sinteză a proteinelor, are o proporţie foarte mică din ARN total, deoarece funcţionează pentru câteva cicluri ale sintezei proteice, după care, fiind instabil, este degradat.

4) *Faza de încetinire a creşterii* se caracterizează prin diminuarea progresivă a ritmului de diviziune. Este o fază scurtă şi la sfârşitul ei, celulele au încetat să se multiplice şi să crească.

5) *Faza staţionară* (sau de creştere maximală) este caracterizată prin faptul că numărul total de celule rămâne constant. Celulele unei culturi în faza staţionară sunt considerate ca tipice pentru specia respectivă: dimensiunile lor sunt normale (mai mici decât cele din faza precedentă), se colorează normal şi pe baza comportamentului lor în colorăţia Gram sunt atribuite grupului Gram pozitive sau Gram negative. În celule apar substanţe de rezervă, vacuole spori.

Faza staţionară corespunde platoului curbei de creştere. Durata ei este variabilă: în mediile sintetice este scurtă.

Oprirea creşterii este datorată epuizării unui compus nutritiv esenţial, denumit *limitant* al creşterii. Dacă componentele minerale ale mediului sunt în exces, compusul limitant este de obicei energetic. În cazul bacteriilor auxotrofe, în prezenţa componentelor minerale şi energetice, oprirea creşterii se datorează epuizării unui factor de creştere.

6) *Faza de declin* a culturii este ilustrată grafic de panta descendentă a curbei. Masa celulară scade progresiv datorită fenomenului de liză. Cu o rată similară scade numărul celulelor viabile. Cele care nu sporulează mor şi se lizează. Morfologia celulelor este alterată. Într-o cultură de bacili apar forme atipice: sferice, filamentoase, ramificate. Celulele conţin substanţe de rezervă, vacuole. Afinitatea pentru coloranţii bazici se diminuează treptat, odată cu scăderea cantităţii de ARN. Sunt celule îmbătrânite. Numărul lor se micşorează treptat, iar pentru speciile nesporulate tinde repede spre 0 şi cultura se sterilizează.

Creşterea colonială. Bacteriile diseminate individual sau ca grupări elementare pe suprafaţa sau în masa unui mediu nutritiv agarizat, se divid şi formează o *colonie bacteriană.* Fiecare colonie, izolată spaţial de vecinele sale, constituie o *clonă celulară.* Numărul celulelor într-o colonie depinde de talia celulelor şi de rata lor de creştere. Numai celulele situate la periferia coloniei, în contact cu mediul nutritiv sunt metabolic active.

Dacă după fiecare diviziune, cele două celule surori se separă complet, colonia va lua o forma regulată: sferică sau de lentilă biconvexă, pentru cea inclusă în grosimea gelozei şi o formă bombată, netedă, pentru cea de pe suprafaţa agarului. Acestea sunt *colonii S(*Smooth).

Dacă celulele surori aderă între ele, aspectul coloniei devine neregulat, cu suprafaţa încreţită, rugoasă, proprie *coloniei de tip R* (*R*ough).

Măsurarea creşterii se face prin determinări cantitative a doi parametri: masa celulară şi numărul de celule. Ambele măsurători se raportează la un volum fix de mediu, de exemplu la *1 ml.* Masa celulară şi numărul de celule nu sunt în mod necesare echivalente pentru că masa celulelor individuale poate să varieze, masa totală a celulelor creşte continuu, iar creşterea numărului de celule este discontinuă în cazul culturilor sincrone. De obicei, multiplicarea într-o populaţie mare de celule este asincronă şi în aceste condiţii creşterea masei celulare şi a numărului de celule sunt echivalente.

Metoda directă de măsurare a masei celulare este determinarea *greutăţii uscate* a celulelor într-un volum fix de cultură. În timpul creşterii compoziţia chimică a materialului celular rămâne constantă.

Masa celulară se poate determina prin metode indirecte: măsurarea conţinutului în C, N sau în proteine.

Metodele indirecte mai sensibile pentru estimarea masei celulare sunt determinările cantitative ale unei enzime particulare sau ale ratei unui proces metabolic cum este respiraţia sau fermentaţia (de exemplu, rata producerii de acid lactic este folosită ca parametru al creşterii bacteriilor lactice).

Metoda optimă pentru măsurarea masei celulare a unei culturi bacteriene este cea *optică*, ce constă în determinarea cantităţii de lumină dispersată de o suspensie celulară. Capacitatea de dispersie a luminii este proporţională cu densitatea suspensiei celulare. Când o rază de lumină trece prin suspensie, reducerea cantităţii de lumină transmisă permite măsurarea densităţii celulare.

Raportul dintre masa de celule în suspensie şi densitatea sa optică, pentru un organism dat, se face empiric prin măsurarea directă a greutăţii uscate a celulelor într-o probă cu o densitate optică dată.

Determinarea numărului de celule se poate face microscopic, numărând celulele într-un volum determinat. Calculul se face cu ajutorul *camerelor de numărat.* Astfel se determină numărul total de celule dintr-o suspensie.

Numărarea automată a celulelor se face cu un instrument electronic (*coulter counter*). O cantitate de suspensie este trecută printr-un orificiu foarte fin. Detectarea celulelor se bazează pe diferenţele de conductivitate electrică între celulă şi mediul de suspensie. Se înregistrează numărul de celule/unitate de volum. Metoda se utilizează pentru numărarea celulelor mari (protozoare, alge), dar numărarea celulelor mici (bacterii) este dificilă, deoarece orificiul trebuie să fie foarte mic, iar mediul nu trebuie să conţină particule neanimate mici, care pot fi uşor înregistrate ca celule bacteriene.

Numărarea microorganismelor unicelulare se face prin *metoda cultivării* (*viable cell plate count*), pentru că celulele viabile separate spaţial una de alta prin dispersie pe sau într-un mediu agarizat, prin creştere formează *colonii* vizibile macroscopic. Metoda permite numai calculul *celulelor viabile*, deoarece determină numai celulele care cresc şi se divid pe un mediu de cultivare.

2.14. Metabolismul bacterian

Metabolismul (*metabole*, lb. greacă = a schimba) este reprezentat de totalitatea reacțiilor biochimice implicate în activitățile biologice ale celulei bacteriene, prin intermediul cărora substanțele biogene sunt preluate din mediul extern şi sunt supuse reacțiilor producătoare de energie şi de biosinteză.

Substanțele sunt preluate din mediul extern, fie sub formă simplă, utilizabilă direct în metabolism, fie sub formă complexă. Substanțele biogene sunt folosite de celulă în următoarele direcții esențiale:

- pentru sinteza *metaboliților primari* (aminoacizi, baze purinice şi pirimidinice, enzime, acizi graşi), necesari biosintezei constituenților structurali, rezultatul fiind creşterea celulei. Aceşti compuşi se sintetizează în faza de creştere primară, denumită şi *trofofază*;
- pentru *producerea energiei*, în metabolismul energetic şi a produselor metabolismului energetic (produşi de fermentație alcoolică, lactică, butirică, propionică, acidă etc.);
- pentru producerea (uneori) a *metaboliților secundari* (antibiotice, alcaloizi, ergotina, giberelina). Se sintetizează în faza de creştere secundară, denumită *idiofază*, după epuizarea unui nutrient major (sursa de C sau de N). Metaboliții secundari nu sunt esențiali pentru creşterea celulei şi sinteza lor este expresia procesului de diferențiere biochimică.

Reglarea metabolismului bacterian este perfectă şi este subordonată principiului *optimalității* activității celulare, astfel încât pierderea de energie să fie minimă.

Reacțiile metabolice fundamentale ale celulelor bacteriene nu diferă mult de acelea care au loc în celula eucariotă. Totuşi, bacteriile au o serie de particularități metabolice, în special ale *metabolismului energetic*, care este mult mai diversificat decât cel al celulei eucariote.

2.14.1. Particularităţile generale ale metabolismului bacterian

Metabolismul bacterian se distinge de acela al celulei eucariote prin câteva trăsături particulare:

1) Metabolismul bacterian are o *intensitate neobişnuită*, de sute şi chiar de mii de ori mai mare decât metabolismul organismelor superioare, raportat la unitatea de greutate (gramul). Diferitele căi metabolice şi activități enzimatice la bacterii se desfăşoară cu o intensitate deosebit de înaltă, proprie acestor organisme. Particularitatea derivă în cea mai mare parte din valoarea înaltă a raportului *suprafață/volum* (greutate celulară). La bacterii, suprafața este foarte mare în raport cu volumul, ceea ce uşurează schimburile între celulă şi mediu. Suprafața de schimb, prin care substanțele nutritive pătrund în celulă, iar cataboliții sunt eliminați, este foarte mare în raport cu volumul celulei, care reprezintă consumatorul.

2) *Natura substratului* pe care bacteriile îl pot cataboliza este foarte diversă. Bacteriile reprezintă grupul cel mai *omnivor* din întreaga lume vie. Ele metabolizează substanțe inaccesibile pentru alte organisme, de la substanțe anorganice simple, inclusiv substanțe toxice pentru sistemele biologice, până la substanțe organice complexe: cauciucul, asfaltul, fenolii, parafinele, petrolul, lemnul, substanțele antibiotice, cheratina, detergenții, masele plastice. Reprezentanți ai g. *Pseudomonas* pot metaboliza până la 200 substanțe diferite.

3) *Plasticitatea metabolismului* bacterian este fără echivalent în lumea vie şi se referă la capacitatea bacteriilor de a folosi, alternativ, diferite surse de carbon şi energie. Foarte multe microorganisme, considerate ca *strict autotrofe* (capabile să utilizeze numai substanțe anorganice pentru nutriție) sunt de fapt *facultativ heterotrofe* şi pot folosi substanțele organice ca substrat generator de potențial reducător. La rândul lor, microorganismele heterotrofe (organotrofe), în absența substanțelor organice utilizează compuşi anorganici.

4) Corelat direct cu intensitatea metabolismului, *potențialul de sinteză* al celulei bacteriene este deosebit de mare, ca o consecință a faptului că, transcrierea este simultană cu traducerea informației genetice. Dacă potențialul de sinteză, exprimat în kg/zi, în mod convențional, la bovine îl considerăm a avea valoarea 1, la soia este 10, la levuri este 10^5, iar la bacterii este 10^{11}, raportat la

unitatea de greutate. O celulă de *E. coli* sintetizează circa 1000 molecule de proteine/secundă, circa 4000 molecule de lipide şi 4 molecule de ARN. Acest uriaş potenţial de sinteză este numai *teoretic* şi ar putea deveni real numai în condiţii optime de mediu. În condiţii obişnuite de mediu, acest potenţial înalt de sinteză se manifestă o perioadă foarte scurtă de timp, datorită factorilor limitanţi ai mediului: diminuarea cantitativă a nutrienţilor, acumularea rapidă a substanţelor toxice şi de catabolism, modificarea pH, variaţiile de temperatură.

5) Metabolismul bacterian se caracterizează prin *diversitatea căilor catabolice* alternative, prin care poate fi degradat un compus chimic: calea glicolizei, a şuntului hexozo-monofosfaţilor, calea Entner-Doudoroff.

2.14.2. Metabolismul energetic bacterian

Metabolismul celulei bacteriene, ca şi al celulei eucariote, are două compartimente fundamentale:

- căile de producere a energiei, denumite *catabolice sau degradative*;
- căile consumatoare de energie, denumite *anabolice sau de biosinteză*.

Deoarece căile catabolice şi anabolice sunt strâns interconectate prin intermediul unor compuşi cheie ai metabolismului intermediar, adevărate "plăci turnante" ale metabolismului, denumirea comună de "căi amfibolice" este justificată.

La bacterii, datorită ratei foarte înalte a metabolismului, funcţionează o categorie specială de căi, denumite *anaplerotice* (sau de alimentare), menite să aprovizioneze o cale metabolică ce funcţionează intens, cu produsul intermediar necesar.

Căile catabolice reprezintă ansamblul proceselor biochimice prin care are loc degradarea nutrienţilor preluaţi din mediu şi eliberarea energiei. Complexitatea reacţiilor catabolice este variabilă, în funcţie de natura şi complexitatea substanţelor supuse proceselor de degradare.

În general, reacţiile catabolice degradative ale unei macromolecule se desfăşoară în trei faze succesive:

- în *prima fază* au loc reacţiile biochimice catalizate de exoenzime, în cursul cărora macromoleculele nutritive sunt *scindate* în spaţiul extracelular, la subunităţile specifice: glucide, aminoacizi, oligopeptide, nucleozide, fosfaţi organici cu moleculă mică (glicerol-fosfat). Bacteriile, fungii şi protozoarele produc enzime extracelulare cu rol de hidrolaze pe care le elimină în mediu sau rămân legate de structurile de suprafaţă ale celulei: *polizaharidaze* (amilază, celulază, pectinază), *mucopolizaharidaze* (hialuronidază, chitinază, neuraminidază, lizozim), *nucleaze*, *lipaze*, *fosfolipaze*, *proteaze*. Ele hidrolizează moleculele mari, rezultând *oligomeri* sau *monomeri*, pentru care structurile celulare de înveliş sunt permeabile. Pentru microorganismele patogene, exoenzimele reprezintă un factor major de virulenţă, deoarece atacă ţesuturile constitutive ale gazdei;
- în *etapa a II-a*, monomerii sunt degradaţi pe căi *specifice* şi rezultă un număr limitat (circa 12) de molecule mici, denumite *intermediari metabolici* ai căilor centrale, aceiaşi la diferite tipuri de bacterii. În această etapă se eliberează circa 1/3 din energia moleculară;
- în *etapa a III-a*, *în aerobioză*, reacţiile evoluează în sensul metabolizării integrale a compuşilor, până la CO_2 şi H_2O, cu eliberarea întregii cantităţi de energie; în *anaerobioză*, reacţiile evoluează după modelul *respiraţiei anaerobe* sau al proceselor *fermentative* şi cantitatea de energie care se eliberează este mică.

Reacţiile catabolice sunt *exergonice*: ele realizează tranziţia unei molecule de la o stare mai puţin stabilă, cu un conţinut mai mare de energie, la molecule mai mici şi mai stabile, cu un conţinut mai mic de energie.

2.14.3. Tipuri de metabolism energetic în funcţie de acceptorul final de electroni

Metabolismul energetic este o înlănţuire de reacţii de oxido-reducere, în cursul cărora substratul energetic este oxidat. Reacţiile de oxidare constau într-o dehidrogenare, în care apa are, în acelaşi timp, rolul de donor de O şi de sursă de protoni şi e^-. Toate reacţiile de oxidare biologică au comun faptul că, în esenţă, semnifică o pierdere de e^- de către substrat şi eliberarea energiei. Molecula

care cedează e^- sau protonii (H^+) se *oxidează*, iar cea care îi acceptă se *reduce*. În funcție de natura acceptorului final de e^-, microorganismele pot prezenta trei tipuri de metabolism energetic:

- metabolism energetic de tip *aerob* (oxibiotic) sau *metabolism respirator*, dependent de *citocromii catenei de respirație celulară*, propriu microorganismelor al căror acceptor final de e^-, la capătul catenei de respirație este O_2;
- metabolism energetic *anaerob* (anoxibiotic), caracteristic microorganismelor al căror acceptor final de e^- este un *compus anorganic* oxigenat (nitratul, sulfatul, carbonatul) sau un compus organic (fumaratul) (Zumft, 1997). În prezența O_2, respirația unora dintre aceste microorganisme este de tip aerob, deoarece catena de respirație celulară este funcțională;
- reacții metabolice de tip *fermentativ* sunt acelea care au loc numai în condiții de anaerobioză, dar *acceptorul final de e^- este un compus organic* (de exemplu, piruvatul).

La bacteriile fermentative lipseşte lanțul citocromilor din catena de respirație, pentru transportul e^-. Substratul acceptor este redus la produse de fermentație (de exemplu, piruvatul, la lactat). Reducerea acceptorului final este cuplată cu reoxidarea coenzimelor.

Pentru nevoile curente ale *cultivării microorganismelor în condiții de laborator* sunt recunoscute următoarele *tipuri respiratorii*:

- bacterii *strict aerobe* sunt acelea care necesită O_2 molecular ca acceptor final de e^-. Ele realizează metabolism de tip oxidativ şi nu cresc în absența O_2. Pentru multe bacterii aerobe este necesară aerarea extensivă, pentru că O_2 este puțin solubil în apă şi nu difuzează cu o rată care să egaleze rata utilizării. Aerarea se face prin agitarea viguroasă a recipientului sau prin barbotarea aerului sterilizat în mediul lichid, printr-un tub de sticlă. Bacteriile aerobe cresc mult mai bine în condiții de aerare forțată decât dacă O_2 difuzează liber;
- bacteriile *microaerofile* folosesc O_2 ca acceptor final de e^-, dar concentrația naturală a O_2, de 20–21% este prea mare şi din această cauză nu cresc pe suprafața mediului expusă aerului atmosferic, dar nu cresc nici în anaerobioză;
- bacteriile *facultativ anaerobe* îşi obțin energia pe cale oxidativă, folosind O_2 ca acceptor final de e^-, dar cresc şi în condiții de anaerobioză şi îşi obțin energia pe cale fermentativă;
- bacteriile *anaerobe* nu folosesc O_2 molecular ca acceptor de e^-. În interiorul acestui grup se disting câteva diviziuni fiziologice:
  a) bacteriile *anaerobe aerotolerante* cresc slab în condiții de aerobioză, într-o ambianță care conține între 2–8% O_2. Creşterea optimă are loc în anaerobioză (de exemplu, bacteriile lactice);
  b) bacteriile *anaerobe obligate* variază în privința sensibilității lor la O_2: unele tolerează cantități mici de O_2, iar altele strict anaerobe nu cresc în prezența unei concentrații mai mari de 0,5% O_2.

Efectul toxic asupra bacteriilor anaerobe îl exercită O_2 şi nu potențialul redox ridicat al mediului. În prezența O_2, bacteriile anaerobe îşi pierd viabilitatea deoarece nu pot să detoxifice intermediarii toxici ai reducerii O_2: H_2O_2, O_2^- (radicalul superoxid), OH^- (ionul hidroxil), $OH^\cdot$ (radicalul hidroxil), $^1O_2$ (oxigen singlet*).

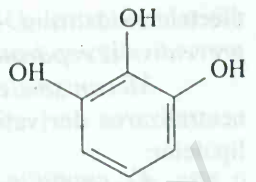
* $^1O_2$ se formează după ce molecula de O_2 absoarbe o cantitate de energie. În molecule, în general, e^- apar în perechi stabilizate, cu spini de direcție opusă. O_2 este o moleculă neobişnuită, prin faptul că spinii electronilor au aceeaşi direcție. Absorbția energiei schimbă unul dintre e^- pe un orbital cu energie mai înaltă şi se produce inversia spinului.

Multe bacterii strict anaerobe sunt bogate în flavine (enzime), care pot reacționa spontan cu O_2 şi forma produse toxice. Din această cauză, cultivarea lor se face în recipiente din care O_2 se elimină complet, pentru a crea un potențial redox scăzut.

Există numeroase procedee pentru *diminuarea conținutului de O_2*:

- unele simple (umplerea recipientelor cu mediu şi acoperirea cu dop de cauciuc), pentru bacteriile care tolerează o concentrație mică de O_2 în mediu;
- altele mai complexe pentru cultivarea bacteriilor strict anaerobe: în mediul de creştere se adaugă *agenți reducători* (acidul tioglicolic, cisteină) sau alături de placa cu mediu, în atmosfera închisă a recipientului de cultivare (pirogalolul).

Agenţii reducători reacţionează cu O_2 dizolvat în mediu sau existent în atmosfera recipientului şi-l reduc la H_2O.



Pirogalolul

2.14.3.1 Respiraţia aerobă

Respiraţia aerobă este procesul catabolic producător de energie în cursul căruia compuşii energetici organici sau anorganici reduşi, cu rolul de *donori* de e^-, sunt degradaţi complet pe cale oxidativă până la CO_2 şi H_2O. În respiraţia aerobă, O_2 este ultimul acceptor de e^- (fig. 27).

Trăsătura distinctivă a procesului respirator este prezenţa mai multor *sisteme redox*, constituite din enzime care alcătuiesc *catena transportoare de e^-*. Electronii sunt transportaţi în cascada enzimelor sistemului redox, permiţând eliberarea treptată a energiei. Lanţul de sisteme redox formează *catena de respiraţie celulară*.

Substratul energetic poate fi *anorganic* pentru bacteriile chimiolitotrofe (H_2, NH_3, nitriţii, S° şi compuşii săi reduşi, compuşii Fe) sau *organic* pentru cele chimioorganotrofe.

Setul de reacţii de importanţă esenţială în respiraţia aerobă este *ciclul Krebs*. Protonii (H^+) cedaţi de diferiţi intermediari ai ciclului Krebs ajung, prin sistemele redox ale *catenei de respiraţie*, la O_2.

Electronii eliberaţi din substrat străbat componentele catenei, până la acceptorul final, O_2 în condiţii de aerobioză sau un *alt acceptor final*, dacă O_2 nu este disponibil. Concomitent se sintetizează ATP. Ansamblul reacţiilor de oxidare şi de fosforilare poartă denumirea de *fosforilări oxidative*.

Testul oxidazei se foloseşte ca un caracter fenotipic pentru identificarea tulpinilor bacteriene cu metabolism respirator de tip aerob. Se determină astfel dacă o tulpină bacteriană produce citocrom-oxidază şi dacă foloseşte O_2 în catena de transport al e^-. Bacteriile care *utilizează* O_2 sunt cele obligat-aerobe, iar cele care *pot* să-l folosească sunt facultative.

Oxidaza este enzima care catalizează reacţia de oxidare/reducere ce implică O_2 ca acceptor de e^-. În aceste reacţii O_2 este redus la H_2O sau H_2O_2. Oxidazele sunt o subclasă a oxido-reductazelor (glucoz-oxidaza, monoamin-oxidaza, NADPH-oxidaza, xantin-oxidaza, lizil-oxidaza, citocrom P_{450} - oxidaza). *Citocrom P_{450} – oxidaza* este enzima cheie componentă a catenei de transport al e^-, ce permite folosirea O_2 în respiraţie pentru generarea energiei.

Mecanisme moleculare protectoare care permit respiraţia aerobă

Multe reacţii biochimice esenţiale pentru metabolismul aerob al celulei necesită transferul a 4 e^- la molecula de O_2 pentru a forma H_2O (după reacţia: $O_2 + 4e^- + 4\,H^+ = 2H_2O$). De cele mai multe ori transferul are loc simultan, fără formarea altor intermediari ai reducerii.

Deoarece O_2 este un oxidant puternic şi acceptor de mare afinitate al e^-, el poate avea rolul de acceptor de e^- nu numai la capătul catenei respiratorii membranare, ci şi în alte reacţii de oxidare a substratului, catalizate de enzimele solubile în citoplasmă. Aceste reacţii pot fi fiziologice, producătoare sau neproducătoare de energie sau sunt nefiziologice şi în anumite condiţii sunt letale, *deoarece O_2 molecular este redus secvenţial*, univalent, formând *intermediari reactivi* cu diferite grade de toxicitate. Reducerea O_2 cu un singur e^- produce *radicalul superoxid* (O_2^-), care la pH fiziologic se reduce încă odată univalent şi formează *H_2O_2* (produsul reducerii bivalente).

Reducerea completă a unei molecule de O_2 la H_2O, necesită 4 e^-. În acest proces se formează compuşi intermediari (radicalul anionic superoxid (O_2^-), peroxidul de O (H_2O_2) şi radicalul hidroxil (OH^-). Ionul O_2^- este eliminat de superoxid dismutaze (SOD), iar H_2O_2 este îndepărtată de catalaze şi peroxidaze.

$$\boxed{O_2} \xrightarrow{e^-} O_2^- \xrightarrow{e^-+2H^+} H_2O_2 \xrightarrow[H_2O]{e^-+H^+} (OH)^- \longrightarrow H_2O$$

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{superoxid dismutaza}} H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaza}} 2H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + RH_2 \xrightarrow{\text{peroxidaze}} 2H_2O + R$$

Intermediarii reducerii O_2 reacţionează cu toate tipurile de macromolecule şi produc leziuni ale moleculelor de ADN, ARN, proteine, iar prin peroxidarea lipidelor apar leziuni membranare.

Toate organismele şi-au dezvoltat *mecanisme protectoare* pentru a atenua

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

efectele oxidanților. Mecanismele de apărare a celulei față de stressul oxidativ sunt de două categorii: *preventive și reparatorii.*

Mecanismele preventive acționează prompt și previn apariția leziunilor oxidative, prin neutralizarea derivaților reactivi ai O_2 sau limitează durata unor reacții, ca de exemplu, peroxidarea lipidelor.

Peroxidul de H (H_2O_2) are o toxicitate moderată. Oxidează componentele membranare și enzimele, lezează ADN și produce mutații, inhibă procesele de transport membanar. H_2O_2 este îndepărtată, cel mai adesea sub acțiunea *catalazei* sau a *peroxidazelor*, care o reduc la H_2O, după reacția:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalaza}} 2\,H_2O + O_2$$

O moleculă de H_2O_2 se reduce, iar alta se oxidează.

Catalaza este o hemoproteină, un homotetramer cu un protohem/subunitate, ce conține 4 grupări hem. Este o enzimă protectoare care catalizează degradarea H_2O_2, prevenind formarea radicalului OH, mai reactiv.

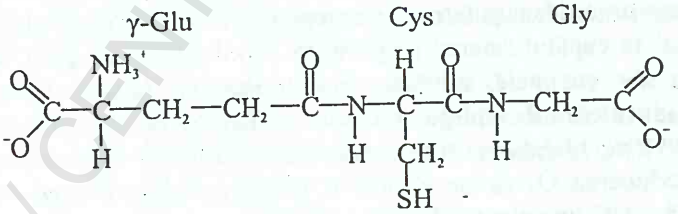
Catalaza se găsește în sânge, măduva osoasă, membranele mucoase, rinichi, ficat. Enzima a dobândit notorietate pentru rolul de activator al izoniazidei, fiind folosită în tratamentul tuberculozei. Pierderea enzimei prin mutație duce la rezistența la izoniazidă, unul dintre motivele creșterii frecvenței tuberculozei.

De cele mai multe ori, este o enzimă neinductibilă. Este produsă abundent de bacteriile aerobe și de cele facultativ aerobe. Cele microaerofile produc cantități mici de catalază. Enzima nu este produsă de bacteriile strict anaerobe și nici de cele anaerobe aerotolerante. Unele bacterii lactice sintetizează totuși o catalază adevărată, dacă în mediu se găsește *hemina*, deoarece ele nu sintetizează grupul prostetic hem al catalazei.

Peroxidazele sunt flavoproteine fără metale grele și catalizează dehidrogenarea unui substrat (AH_2), în prezența H_2O_2. Cea mai importantă este NADH-peroxidaza. Peroxidazele se găsesc la plante, animale și microorganisme și catalizează oxidarea diferitelor substraturi pe seama peroxidului:

$$NADH + H^+ + H_2O_2^{--} \longrightarrow NAD^+ + 2\,H_2O$$

Glutationul este substratul glutation-peroxidazei (GP) care îndepărtează H_2O_2 și peroxizii lipidici care rezultă din atacul radicalilor liberi asupra lipidelor.



Structura glutationului: L-γ-Glutamil- L-Cysteinil-Glycină. Glutationul este compusul tiolic al multor celule procariote și eucariote. Lipsește la eucariotele care nu au mitocondrii.

Ionul O_2^- (superoxid) se formează în cantități mici în timpul procesului respirator normal, prin reducerea univalentă ($O_2 + e^- = O_2^-$). Are reactivitate moderată, capabil să acționeze ca oxidant sau ca reducător în sistemele biologice. Este relativ stabil, ceea ce îi permite să difuzeze la distanțe relativ mari înainte de a-și exercita efectele toxice. O_2^- generat extracelular poate dobândi acces la țintele intracelulare pe calea canalelor pentru anioni. La pH acid (în focarul inflamator sau în interiorul fagosomului), O_2^- se protonează și formează HO_2^- (hidroniu) cu sarcină neutră și de aceea trece mai ușor prin membrane și reacționează cu sine însuși, formând H_2O_2.

O_2^- produce distrugerea oxidativă (peroxidarea) lipidelor (introducerea neenzimatică a O în catenele de acizi grași nesaturați) și a altor componente ale celulei. Este cel mai stabil dintre toți

intermediarii reducerii O_2 şi poate acţiona succesiv, asupra mai multor molecule. O_2^- este eliminat sub acţiunea *superoxid-dismutazelor* (SOD). SOD se combină cu 2 molecule de O_2^-, după reacţia:

$$2\,O_2^- + 2\,H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2 \text{ sau } O_2^- + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

Ionul superoxid este eliminat rapid şi nu se acumulează în celulă. Anihilarea O_2^- este o strategie esenţială de apărare, deoarece nu numai că limitează acţiunea sa directă, dar previne reducerea Fe mediată de O_2^- şi generarea OH (Lovely, 1991).

Unii fungi şi puţine bacterii produc în special *CuZnSOD*, homodimere, fiecare subunitate cu câte un atom de Cu şi Zn. Bacteriile anaerobe *obligate* produc în special *FeSOD* (dimeri), iar cele *aerobe* produc predominant *MnSOD* (dimeri şi tetrameri). Unele bacterii produc ambele tipuri de SOD. Unele bacterii patogene (*M. tuberculosis*) secretă FeSOD în mediul extracelular, ca mecanism de rezistenţă la atacul oxidant. La bacteriile facultativ-anaerobe (*E. coli*), SOD este periplasmică şi nivelul activităţii ei creşte după expunerea la O_2.

Singurele organisme care nu posedă enzime protectoare sunt bacteriile anaerobe stricte. De aceea, O_2 exercită efecte toxice letale asupra lor.

Radicalul hidroxil liber (OH) se formează prin *reducerea trivalentă* a O_2 *in vitro,* prin reacţia H_2O_2 cu O_2^-. Această reacţie este amplificată de un catalizator metalic (Fe^{3+}). Radicalul se formează şi ca rezultat al acţiunii radiaţiei ionizante.

OH este cel mai puternic agent oxidant dintre toţi intermediarii reducerii O_2. OH oxidează toate categoriile de macromolecule (proteine, ADN, lipide). Este probabil unul dintre agenţii care omoară celulele după iradiere x sau γ.

Datorită reactivităţii foarte înalte, difuzia OH este limitată înainte de a întâlni substraturile oxidabile. Oxidarea acizilor graşi nesaturaţi într-o membrană lipidică poate produce *radicalul peroxil* (HO_2), care reacţionează cu alte molecule lipidice învecinate, generând alţi radicali lipidici. Se iniţiază reacţia în lanţ a radicalilor liberi, care se propagă la situsuri îndepărtate de situsul primar al reacţiei.

Oxigenul singlet ($^1O_2$) este o formă moleculară cu energie superioară şi se formează când cei doi e^- pereche dobândesc spini antiparaleli, fie că se află pe acelaşi orbital, fie pe orbite diferite. În această formă, O_2 nu primeşte un e^- suplimentar, ci numai *energie* suplimentară, care schimbă spinul unuia dintre e^-.

$^1O_2$ este un poluant atmosferic. Poate fi produs fie spontan, fie prin sisteme enzimatice. Cea mai comună cale chimică a producerii sale este *reacţia O_2 cu lumina vizibilă.* Procesul implică prezenţa unei molecule a unei substanţe colorate care absoarbe lumina.

$^1O_2$ se generează prin acţiunea lactoperoxidazei şi mieloperoxidazei, prezente în lapte, salivă şi în fagocite. În fagocite, $^1O_2$ are rolul de a omorî agentul fagocitat. În prezenţa $^1O_2$ se produc reacţii de oxidare, al căror rezultat este distrugerea oxidativă a componentelor celulare vitale, ca de exemplu, fosfolipidele membranei celulare.

Mecanismele reparatorii acţionează tardiv şi repară leziunile cauzate de molecule reactive care nu au fost anihilate de sistemele de apărare preventivă. Fiecare condiţie de stres induce sinteza unui set de proteine, unic pentru categoria agentului inductor al stresului. Unele proteine induse de stresul oxidativ sunt comune şi pentru alte tipuri de stres (stresul hipertermic, înfometarea etc.).

Stresul oxidativ alterează numeroase căi metabolice. Gradul de alterare este dependent de capacitatea de răspuns al celulei la stres. Eliminarea timpurie a stresului oxidativ, prin mecanismele preventive este esenţială pentru supravieţuirea celulei.

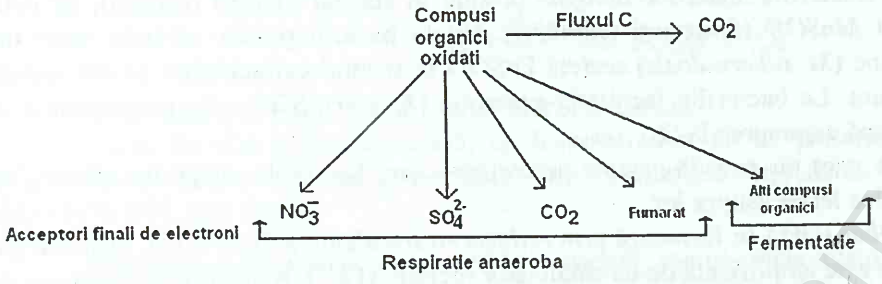
2.14.3.2 Respiraţia anaerobă

Majoritatea organismelor capabile de respiraţie anaerobă sunt procariote. Bacteriile anaerobe nu au sistemul citocromilor pentru metabolismul O_2. Cele aerotolerante au niveluri scăzute de SOD, iar catalaza este prezentă sau absentă. Dacă anaerobii au SOD şi catalază evită efectul toxic al radicalilor O_2 şi H_2O_2 şi tolerează O_2. Unele dintre bacteriile heterotrofe care realizează respiraţia anaerobă au catenă de respiraţie şi sunt *facultativ anaerobe*. În prezenţa O_2, realizează metabolism

oxibiotic. Transformările chimice pe care le realizează în timpul generării energiei, în absența O_2, au o deosebită importanță ecologică sau industrială.

În absența O_2, bacteriile heterotrofe facultativ-anaerobe își obțin energia din substratul energetic, fie prin *respirația anaerobă*, fie prin *fermentație*. Respirația anaerobă este mai eficientă din punct de vedere energetic, comparativ cu fermentația.

În procesul respirației anaerobe, e^- cedați de substratul organic oxidabil sunt preluați de catena de respirație celulară și sunt transferați unui acceptor final, care este fie un *compus oxigenat* (*nitrat, sulfat, carbonat*), fie un singur compus organic (*fumaratul*). Transferul e^- de-a lungul catenei respiratorii este cuplat cu fosforilările oxidative membranare.



Acceptorii finali de electroni în respirația anaerobă și în fermentații. Catabolismul compușilor organici produce CO_2.

2.14.3.3. Fermentația

Denumirea de "fermentație" vine din lb. latină (*fervere* = a fierbe) și semnifică degajarea, uneori abundentă, a CO_2 în timpul fermentației. Studiul științific al fermentațiilor a fost inițiat de L. Pasteur. În perioada 1857–1875, el a demonstrat că procesele de transformare biochimică a unor substraturi sunt consecința "vieții fără aer" a unor microorganisme, cu rolul de fermenți.

Din punct de vedere *fiziologic, fermentația este un proces catabolic producător de energie în absența O_2, în care compușii organici au rolul de donori și de acceptori de electroni.* Compușii chimici care îndeplinesc aceste funcții sunt, de regulă, metaboliți derivați dintr-un substrat fermentabil (de exemplu, un glucid). Procesele redox se produc în absența oricărui acceptor terminal de electroni.

Din punct de vedere *biochimic*, fermentația poate fi definită ca un ansamblu de reacții biochimice anaerobe de oxidare și de reducere care furnizează celulei energia necesară prin mecanismul *fosforilărilor la nivelul substratului*, care au loc în citoplasmă.

Funcția majoră sau unică a fermentației este cea energetică, adică producerea ATP. ATP rezultă prin transferul grupelor fosfat din intermediarii fosforilați cu potențial energetic înalt ce se formează în timpul degradării substratului.

Fermentațiile se desfășoară în *condiții anaerobe*. La microorganismele strict anaerobe, în prezența O_2, căile fermentative sunt represate și nu se dezvoltă, iar cele facultativ-anaerobe își schimbă calea metabolică de producere a energiei, de la fermentație la respirație. *Inhibiția fermentației în aerobioză* la microorganismele aerobe-facultativ anaerobe, poartă denumirea de *efect Pasteur** și se manifestă prin diminuarea netă a cantității produselor de fermentație, precum și prin creșterea randamentului energetic ce se reflectă în producerea unui volum net superior de biomasă pentru aceeași cantitate de substrat consumat. Efectul inhibitor al O_2 asupra fermentației la microorganismele facultativ anaerobe ar fi datorat inactivării uneia dintre enzimele cheie ale căii Embden-Meyerhof, *fosfofructokinaza*. Numai bacteriile lactice fac excepție: O_2 nu modifică modul lor de a produce energie, astfel încât fermentația continuă chiar în prezența O_2.

*O celulă facultativ-anaerobă metabolizează glucoza pe cale aerobă sau anaerobă. În anaerobioză, glucoza este degradată la lactat, rata degradării fiind mult mai mare decât în condiții aerobe. Diferența se datorează randamentului mai mic de sinteză a ATP/moleculă : în timpul glicolizei se produc 2 molecule de ATP/moleculă, iar în aerobioză se sintetizează 36 molecule de ATP/moleculă. În anaerobioză, pentru sinteza aceleiași mase celulare este necesară de 18 ori mai multă glucoză.

Dacă suspensia celulară anaerobă se oxigenează, rata de consum a glucozei scade foarte mult, iar acumularea lactatului scade până spre 0. Fenomenul inhibării consumului de glucoză și stoparea acumulării lactatului în prezența O_2 se numește *efect Pasteur*. Efectul s-a descoperit pentru fermentația alcoolică, dar este o caracteristică a tuturor celulelor facultative, inclusiv a celulelor musculare.

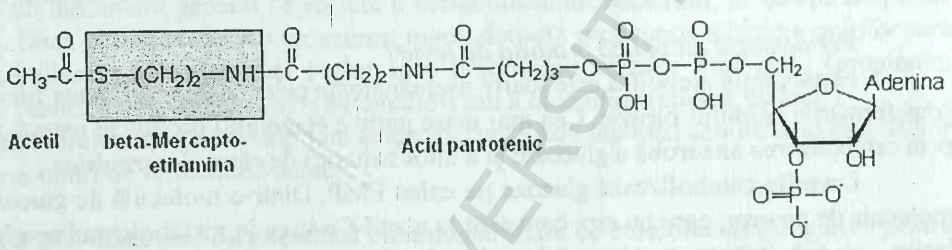
Substraturile fermentabile sunt compuşi organici diverşi: glucide sau compuşi înrudiţi (acizi organici, alcooli), aminoacizi, amine, purine, pirimidine. În procesul fermentaţiei, anumiţi compuşi organici, de obicei doi metaboliţi diferiţi, derivaţi dintr-un substrat fermentabil, au rolul de *donor* şi respectiv, de *acceptor de e⁻*.

În procesul fermentativ este menţinut *echilibrul redox.* Nivelul mediu de oxidare a produselor finale este egal cu al produsului fermentabil: din glucoză rezultă atât metaboliţi oxidabili, cât şi reductibili.

Degradarea substratului în fermentaţie este *incompletă* şi de aceea se eliberează o cantitate mult mai mică de energie decât în procesul de respiraţie, în cursul căreia oxidarea substratului este completă.

Procesele de fermentaţie sunt iniţiate de *fosforilări la nivelul substratului.* Rezultatul lor este sinteza ATP, dar şi a altor compuşi cu o legătură bogată în energie, cel mai important fiind *acetil-CoA.*

Diferenţa esenţială între metabolismul aerob şi anaerob constă în soarta *acidului piruvic* şi a *NADH.* În metabolismul aerob, NADH este oxidat în catena transportoare de e, cu sinteza ATP prin fosforilare oxidativă, iar în anaerobioză NADH este folosit în reducerea anaerobă a compuşilor organici.



Structura moleculară a acetil – CoA.

Glucoza poate fi fermentată virtual de toate bacteriile anaerobe. Fermentaţia ei este cel mai cunoscut proces fermentativ şi este iniţiat printr-o reacţie de fosforilare, în urma căreia rezultă *glucozo-6 fosfatul.* Se consideră că procesul decurge în două etape:

- în prima etapă se desfăşoară *reacţiile de oxidare* a glucozei. Rezultatul lor este formarea intermediarului central al metabolismului fermentativ al glucidelor – *acidul piruvic.* Acest compus este mai oxidat decât glucoza şi diferenţa de potenţial redox este stocată în piridin-nucleotidele reduse;
- în etapa a II-a au loc reacţii de *reducere a compuşilor intermediari*, prin care se formează mai multe produse finale.

Glucoza este oxidată pe una din următoarele 4 căi:

- *calea Embden-Meyerhoff-Parnas* (EMP, denumită şi calea hexozo-difosfatului sau a glicolizei);
- *calea hexozo-monofosfatului* (HMP, denumită şi calea pentozo-fosfatului);
- *calea fosfocetolazei*;
- *calea Entner-Doudoroff.*

Fermentaţia lactică

Fermentaţia lactică este procesul biologic prin care microorganismele catabolizează glucoza din mediu şi o transformă în acid lactic. În cantitate mică, acidul lactic este produsul de catabolism al unui număr mare de microorganisme, dar unele bacterii furnizează acidul lactic ca produs principal al metabolizării glucidelor.

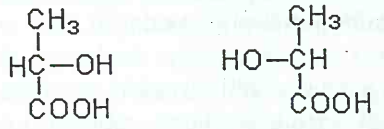
Bacteriile lactice se împart în două categorii:

a) bacteriile *homofermentative* produc numai acid lactic ca produs final al procesului fermentativ: *Lactobacillus delbrueckii, L. bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, Streptococcus lactis, S. cremoris, S. thermophilus*;

b) bacteriile *heterofermentative* produc, pe langă acid lactic, cantităţi mari ale altor produse finale (CO_2, etanol, acid acetic, glicerină, manită, în funcţie de specie): *L. brevis, L. lycopersici, Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, L. citrovorum.*

Cantităţi mari de acid lactic sunt produse de unii fungi filamentoşi (*Rhizopus*), dar pentru producerea industrială a acidului lactic se folosesc bacteriile lactice.

Bacteriile lactice sunt Gram pozitive, nesporulate, anaerobe-aerotolerante sau microaerofile, mobile, nepatogene şi cresc în mediu acid.



Acidul lactic (α-hidroxipropionic) conţine un atom de carbon asimetric şi de aceea poate exista sub două forme optic active: izomerii D (-) şi L (+).

Fermentaţia aceto-lactică

Bacteriile din genul *Bifidobacterium*, într-o fermentaţie mixtă aceto-lactică produc un amestec de acizi lactic şi acetic, după reacţia:

2 Glucoză ⟶ 3 Acid acetic + 2 Acid lactic

Glucoza este fosforilată şi convertită la fructozo-6 fosfat, ca şi în calea glicolitică EMP. Fructozo-6 fosfatul este clivat într-o reacţie de fosforilare cu fosfat anorganic, într-o moleculă de acetil-fosfat şi eritrozo-4 fosfat. Reacţia eritrozo-4 fosfatului, cu o moleculă de fructozo-6 fosfat iniţiază o serie complexă de rearanjări moleculare, din care rezultă gliceraldehid-3 fosfat şi acetil-fosfat.

Fermentaţia alcoolică produsă de levuri

Fermentaţia alcoolică este foarte asemănătoare celei lactice, diferenţa fiind numai cu privire la transformările acidului piruvic. Cea mai mare parte a etanolului produs în natură şi în industrie rezultă prin catabolizarea anaerobă a glucozei şi a altor zaharuri de către *S. cerevisiae*.

Levurile catabolizează glucoza pe calea EMP. Dintr-o moleculă de glucoză se formează două molecule de *piruvat*, care nu este convertit la acetil-CoA, ca în metabolismul aerob şi nici redus la acid lactic, ci sub acţiunea *piruvat-decarboxilazei*, o enzimă cheie în fermentaţia alcoolică, este decarboxilat la *acetaldehidă*. Acetaldehida este redusă de NAD-reductază, la *etanol*.

Producţia netă de ATP în fermentaţia alcoolică este de două molecule pentru fiecare moleculă de glucoză, mult mai mică decât în catabolizarea aerobă.

Prin transferul celulelor în condiţii anaerobe, rata degradării glucozei se intensifică de 3-4 ori. Transferul invers este însoţit de diminuarea ratei de catabolizare a glucozei şi oprirea fermentaţiei alcoolice. Fenomenul poartă denumirea de "efect Pasteur".

Fermentaţia alcoolică bacteriană

O altă cale a fermentaţiei alcoolice este aceea care se desfăşoară în celulele bacteriene saprobionte anaerobe, aerotolerante, ce aparţin genului *Zymomonas*. Glucoza este catabolizată pe calea Entner-Doudoroff (ED).

Calea ED a fost descoperită la *Pseudomonas saccharophila* şi la *Zymomonas mobilis*, dar este funcţională şi la unii viermi paraziţi.

Primul intermediar al căii este *glucozo-6 P*, care este oxidat, ca şi pe calea HMP, la *6-fosfo-gluconat*.

Prin reacţia de dehidrogenare, 6-fosfo-gluconatul formează un compus intermediar – *2-ceto-3-dezoxi-6-fosfo-gluconatul*, care este scindat sub acţiunea *aldolazei, la piruvat şi aldehida-3-fosfoglicerică*.

Aldehida-3-fosfoglicerică poate fi catabolizată de enzimele căii EMP şi rezultă piruvat sau de enzimele căii HMP şi se formează precursori pentru biosinteza ADN, ARN, a vitaminelor, aminoacizilor aromatici etc. Calea funcţionează şi la *Rhizobium*. Lipseşte la bacteriile Gram pozitive, cu excepţia unora din g. *Nocardia*.

Bacteriile din g. *Zymomonas* metabolizează piruvatul prin decarboxilare, deoarece au o enzimă rară la bacterii – *piruvat-decarboxilaza*. Pe această cale, dintr-o moleculă de glucoză se formează două molecule de *etanol* şi două molecule de CO_2.

Multe bacterii lactice, enterobacterii şi clostridii formează cantităţi mari de piruvat în procesul fermentaţiei, dar nu au piruvat-decarboxilază pentru producerea acetaldehidei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Catabolismul piruvatului

Piruvatul este catabolizat pe cale aerobă sau anaerobă. Microorganismele strict aerobe sau cele facultative, realizează în prezența O_2 decarboxilarea oxidativă a piruvatului și formează acetil-coenzima A, care intră în ciclul Krebs, la nivelul oxalo-acetatului.

În anaerobioză, piruvatul este decarboxilat sub acțiunea piruvat-decarboxilazei și se formează acetaldehidă și CO_2, redusă ulterior la etanol, de către bacteriile din genul *Zymomonas*.

Piruvat-decarboxilaza poate fi asociată cu un sistem transportor de electroni, până la CO_2.

Fermentațiile acide

La cele mai multe bacterii, catabolizarea glucozei la acid piruvic se desfășoară pe calea EMP.

Există câteva tipuri de fermentații care se deosebesc de fermentația homolactică prin reacția de reducere a *piruvatului*, deoarece numai o parte a acestui intermediar este redusă direct la *lactat*, dar majoritatea moleculelor sale sunt supuse unei reacții de *decarboxilare*, sub acțiunea piruvat decarboxilazei. Se formează *acetaldehida*, care este oxidată în trepte succesive, rezultatul fiind un amestec de produse de fermentație în care predomină *acizii*.

Echilibrul cantitativ al produselor finale depinde de echipamentul enzimatic al speciei bacteriene, dar și de un mecanism general de reglare a metabolismului bacterian, în funcție de pH-ul mediului de creștere. Dacă pH-ul scade sub un anumit nivel, datorită producerii inițiale a *acizilor tari* (acetic, lactic), metabolismul bacterian este reglat spre producerea *acizilor mai slabi* (propionic, butiric) și în anumite cazuri, a corpilor *cetonici* (butanediol) sau a *alcoolilor* (etanol, butanol).

Cele mai multe fermentații bacteriene sunt acide. În funcție de raportul cantitativ al produselor finale se disting câteva tipuri de fermentații acide.

Fermentația acidă mixtă este caracteristică unui număr mare de enterobacterii negative pentru reacția Voges-Proskauer și se caracterizează prin acumularea de acetil-metil-carbinol ($CH_3 - CO - CHOH - CH_3$). În varianta sa cea mai simplă, fermentația acidă mixtă este rezultatul a două serii principale de reacții:

- *reducerea* directă a *piruvatului la lactat*;
- *clivarea piruvatului la formiat și acetil*, în prezența CoA^-.

Produsele finale ale fermentației acide mixte sunt lactatul, acetatul, etanolul și formiatul. Consecutiv clivării formiatului, la multe enterobacterii *(E. coli)*, din fermentația glucozei rezultă gaze (CO_2, H_2). Dacă din echipamentul enzimatic lipsește *formiat-liaza*, fermentația se produce fără gaze.

Unele enterobacterii, în special cele care au formiat-dehidrogenază, produc o cantitate mică de *acid succinic*, în prezența ATP, prin reacția de condensare a unei molecule de CO_2 cu o moleculă de piruvat. Reacția este catalizată de piruvat-feredoxin-oxidoreductază.

Proporția produselor finale ale fermentației depinde de condițiile de cultivare. Valoarea pH a mediului scade datorită acumulării acizilor rezultați în fermentație.

Fermentația butirică este caracteristică, dar nu exclusivă, bacteriilor zaharolitice din g. *Clostridium*. Butiratul se formează pe o cale metabolică ce începe cu clivarea *piruvatului*, în prezența CoA, în acetil-CoA, CO_2 și H_2. CO_2 și H_2 se formează direct, fără faza intermediară a acidului formic.

Conversia piruvatului la acetil-CoA implică sistemul enzimatic al *piruvat-feredoxin-oxidoreductazei* (PFO), o enzimă ce catalizează oxidarea piruvatului pentru a forma acetil-CoA și CO_2. Feredoxinele sunt proteine mici, foarte acide, cu rolul principal de transportori de e^-, care conțin ca grupări prostetice aglomerări de metale: 2Fe-2S, 4Fe-4S sau 3Fe-4S. Au potențial redox mic și funcționează ca transportori de e^- în procese metabolice fundamentale ca fotosinteza, fixarea N_2, asimilarea H_2 și S. Electronii pot fi donați unei hidrogenaze, cu formarea H_2. Cele mai comune feredoxine bacteriene conțin 2 aglomerări de metale într-un lanț peptidic de 50–60 de resturi, sunt specifice anaerobilor și au rolul de transfer al e^- în sistemele cu potențial redox scăzut.

PFO are un rol important în procesele de oxido-reducere ale bacteriilor anaerobe (*Clostridium*). Enzima permite reutilizarea H_2 ca potențial reducător, având rol de hidrogenază de înglobare. Are un potențial redox foarte mic, asemănător cu al H_2 (-0,42 V). Funcția de hidrogenază de înglobare a PFO catalizează reducerea produselor primare acide ale fermentației mixte, rezultate din

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

acidul piruvic, la molecule neutre: prin reducerea aceto-acetilului rezultă butanol, prin decarboxilarea aceto-acetil-CoA se formează acetona, iar prin reducerea acetonei rezultă izopropanol.

Recircularea H_2 şi utilizarea sa ca potenţial reducător păstrează echilibrul redox al mediului de creştere a acestor bacterii.

Fermentaţia butanediolului (2,3 butan-glicol) este produsă de unele enterobacterii (*Vibrio* sp., *Aeromonas* sp.), de unele specii de *Bacillus* şi de unele bacterii lactice (*Streptococcus cremoris, Lactobacillus cremoris*).

Pe lângă sistemul enzimatic al fermentaţiei acide mixte, ele au şi setul de enzime al fermentaţiei particulare, denumită *butanediolică* sau *butilen-glicolică*, care furnizează ca produs final o moleculă neutră de 2,3-butanediol. Această cale metabolică se activează după ce valoarea pH a mediului de creştere scade sub 6.

Reacţia cheie a căii este cea de *condensare* a două molecule de *piruvat*, prin decarboxilare şi eliberare a acidului formic. Rezultă *diacetilul*, care este redus la *acetoină* (acetil-metil-carbinol). Acetoina este redusă şi se formează *butanediolul.*

Diacetilul şi acetoina dau aroma caracteristică untului. Diacetilul se formează din lapte. Citratul este scindat în acetat şi oxalo-acetat. Oxalo-acetatul este decarboxilat la piruvat.

La enterobacterii, butanediolul se formează pe calea acetolactatului.

Acetolactatul este decarboxilat sub acţiunea aceto-lactat-decarboxilazei şi se formează *acetoina*, care este redusă la *butanediol.*

Calea fermentaţiei butanediolice se evidenţiază prin reacţia Voges-Proskauer* şi prin valoarea relativ ridicată a pH.

* Reactia Voges-Proskauer evidenţiază capacitatea unor microorganisme de a produce prin fermentaţia glucozei, acetil-metil-carbinol (acetoina), care în prezenţa alcalilor este oxidat la diacetil. Diacetilul se combină cu arginina, creatina sau cu creatinina din mediu şi determină apariţia culorii roşii.

Fermentaţia acidului propionic

Acidul propionic este produs pe cale fermentativă de un grup de bacterii nesporulate din g. *Propionibacterium.* Ele pot fermenta *acidul lactic* (produsul final al altor fermentaţii bacteriene) (fig. 66). Se formează acid propionic, acid acetic şi CO_2. Această cale de fermentaţie permite generarea ATP prin metabolizarea *acidului lactic sau a acidului piruvic*, rezultat pe calea glicolizei.

2.14.4. Catabolismul lipidelor

Trigliceridele sunt hidrolizate la glicerol si acizi graşi, sub acţiunea exo- sau endolipazelor. Aceste enzime sunt produse de fungi filamentoşi (*A. flavus, P. roqueforti, Rhizopus sp., Geotrichum*), levuri (*Candida lipolytica, Torulopsis, S. cerevisiae*), bacterii (*Serratia liquefaciens, Ps. aeruginosa, Alcaligenes sp., S. aureus*).

Glicerolul intră în calea glicolizei, la nivelul *dihidroxi-aceton-fosfatului*, trecând prin *dihidroxi-acetonă* sau prin *glicerol fosfat.* Ulterior, aceste produse sunt degradate pe *calea glicolizei.* Procesul este anaerob.

Acizii graşi sunt activaţi de ATP în prezenţa CoA şi se formează acil-CoA. Acesta este oxidat la carbonul beta (β-oxidare) şi prin hidroliză rezultă acetil-CoA. AG β-oxidat este mai scurt decât cel iniţial cu doi atomi de carbon.

2.14.5. Catabolizarea compuşilor organici azotaţi

Numeroase bacterii (în special din genurile *Clostridium* şi *Bacillus*) secretă exoproteaze care scindează lanţurile polipeptidice în fragmente de câţiva aminoacizi. Sinteza enzimelor proteolitice este represată dacă în mediu se adaugă hidrolizat de proteine sau amestec de aminoacizi. Peptidazele hidrolizează polipeptidele şi le transformă în aminoacizi. În funcţie de modul de acţiune asupra lanţului polipeptidic, peptidazele sunt de două tipuri: endopeptidaze şi exopeptidaze. La rândul lor, exopeptidazele sunt de două categorii:

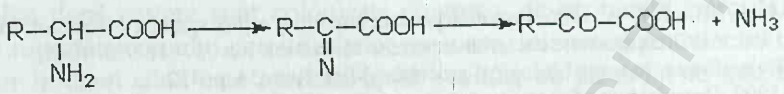
– *aminopeptidaze*, cele care încep acțiunea lor la extremitatea NH_2 liberă a polipeptidului. Activitatea lor depinde de prezența ionilor metalici;
– *carboxipeptidaze*, cele a căror acțiune se inițiază la extremitatea COOH liberă a polipeptidului.

Acțiunea acestor enzime are ca efect formarea di- și tripeptidelor, ulterior hidrolizate în aminoacizi.

Majoritatea bacteriilor oxidează puțin sau deloc aminoacizii. Ele sunt mult mai active în sinteza decât în degradarea lor, în special în faza de creștere rapidă. Unele bacterii pot degrada aminoacizii, în special dacă aceștia sunt unica sursă de C în mediu. La plantele superioare, ca și la bacterii, dominantă este sinteza, deoarece ca și bacteriile, tind să crească continuu.

Aminoacizii sunt catabolizați pe două căi principale:
– *prin dezaminare;*
– *prin decarboxilare.*

Dezaminazele microorganismelor sunt foarte diverse. Ele cuprind enzime oxidative și neoxidative. Rezultatul dezaminării oxidative este formarea *iminoacidului*, care este apoi hidrolizat în acid α- cetonic și NH_3:



Dezaminarea neoxidativă poate fi de trei feluri:
– *dezaminare desaturantă*, cu formarea acidului nesaturat și a NH_3;
– *dezaminare reductivă*, ce constă în reducerea aminoacizilor la acidul saturat corespunzător și formarea NH_3;
– *dezaminare prin deshidratare*, o cale exclusivă a microorganismelor pentru aminoacizii hidroxilați. Se formează acidul cetonic și NH_3;

Un tip special de dezaminare este *dezaminarea cuplată* (reacția Stickland). Reacția se numește dezaminare cuplată, deoarece necesită cel puțin o pereche de aminoacizi complementari, unul fiind oxidat, iar celălalt având rolul de acceptor de electroni.

Aminoacidul donor este oxidat sub acțiunea unei NAD-dehidrogenaze. Rezultatul reacției este dezaminarea celor doi aminoacizi. Acidul alfa-cetonic este decarboxilat secundar, reacție în cursul căreia se produce fosforilarea la nivelul substratului (pentru o pereche de aminoacizi se sintetizează o moleculă de ATP).

Mecanismul reacției Stickland, ca modalitate a metabolismului fermentativ producător de energie. L-alanina are rol de donor de e^-, iar glicina de acceptor. Ambele sunt convertite la acid acetic.

După comportamentul lor în reacția Stickland, aminoacizii se împart în trei grupe: reducători, oxidanți și cei care se comportă ca reducători sau oxidanți, în funcție de condițiile de mediu.

Reacția de dezaminare cuplată este catalizată de numeroase bacterii anaerobe (de exemplu, *Clostridium*).

Decarboxilarea aminoacizilor este o cale de catabolizare comună multor microorganisme, proteolitice sau neproteolitice. Se formează CO_2 și o *amină*.

Un mediu acid favorizează biosinteza decarboxilazelor și pH crește, datorită producerii NH_3, ureii, aminelor, iar într-un mediu alcalin este stimulată sinteza dezaminazelor și valoarea pH scade.

Unele bacterii își obțin energia prin catabolizarea unui singur aminoacid (arginina), pe căi fermentative foarte specifice și complexe sau prin fermentarea unor compuși aminați (purine, pirimidine).

2.14.6. Catabolismul compușilor aromatici

În raport cu capacitatea de a metaboliza compușii aromatici, bacteriile se împart în trei categorii:
– cele care nu degradează astfel de compuși;
– cele care realizează o degradare incompletă (de exemplu, enterobacteriile). *E. coli* scindează *triptofanul* la indol și piruvat, sub acțiunea unei triptofanaze, fără să deschidă

ciclul benzenic sau pirolic. Reacţia de evidenţiere a indolului în mediile nutritive peptonate este un test de identificare a enterobacteriilor, utilizat frecvent;

– bacteriile care metabolizează complet compuşii aromatici, prin ruperea structurilor ciclice. Reacţia de clivare a moleculelor ciclice este generatoare de energie. *E. coli* scindează triptofanul la indol şi acid piruvic.

Bibliografie

Schnaitman C. A., Klena J. D. 1993. Genetics of lipopolysccharidae biosynthesis in enteric bacteria. Microbiol. Rev. 57 (3) : 655–682.

Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev. 565 (3) : 430–481.

Mihăescu G., Ionescu M.D., Mencinicopschi Gh. 1991. Electron-optic studies of protoplasts release from I C A-1.65 line of *Bacillus subtilis* cells. Roum. Arch. Micr. Immun. 50, 1, 27–35.

Magnuson K., Jackowski S., Rock C. O., Cronan J. E. Jr. 1993. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli.* Microbiol. Rev. 57(3): 522–542.

Maloney P. C., Ambudkar S. V., Anatharam V., Sonna L. A., Varadhachary A. 1990. Anion-exchange mechanisms in bacteria. Microbiol. Rev. 54(1): 1–17.

Paulsen I. T., Brown M. H., Skurray R. A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. 60(4): 575–608.

Fath M. J., Kolter R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. Microbiol. Rev. 57 (4): 995–1017.

Wiggins P. M. 1990. Role of water in some biological processes. Micr. Rev. 54, p. 432.

Krawiec S., Riley M. 1990. Organization of the bacterial chromosome. Microbiol. Rev. 54(4): 502–539.

Matthews K. S. 1992. DNA looping. Microbiol. Rev. 56 (1): 123–136.

Robinow C., Kellenberger E. 1994. The bacterial nucleoid revisited. Microbiol. Rev. 58(2): 162–210.

Laursen B. S., Sorensen H. P., Mortensen K. K., Sperling Peterson H. U. 2005. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. MMBR. 69, 1, pp. 101–123.

Pugsley A. P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram negative bacteria – Microbiol. Rev. 57(1): 50–108.

Simonen M., Palva I. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol. Rev. 57(1): 109–137.

Michael Dunne Jr. 2002. Type III Secretion System in Bacteria. Clin. Micr. Reviews. 15: 2

Henderson I.R., Garcia F.N., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D. 2004. Type V Secretion Pathway: the Autotransporter Story – MMBR. 68, 4: 692–744.

Ghosh P. 2004. Process of Protein Transport by the Typ III Secretion System. MMBR. 68, 4:771–795.

Coburn B., Sekirov I., Finlay B.B. 2007. Type III Secretion Systems and Disease. Clin. Micr. Reviews. 20, 4: 535–549.

Craig E. A., Gambill B. D., Nelson R. J. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. Microbiol. Rev. 57(2): 402–414.

Errington J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. Microbiol. Rev. 57(1): 1–33.

Brock T. 1988. Biology of microorganisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2004. Kenneth Todar, University of Wisconsin, http://www.textbookofbacteriology.net/

Ross P., Mayer R., Benziman M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol. Rev. 55 (1): 35–58.

Zumft W. G. 1997. Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. MMBR 61, 4 : 533–616.

Lovely D. R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Microbiol. Rev. 55(2): 259–287

Lodish H. Molecular cell biology. 5th Edition

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. MICROBIOTA NORMALĂ A ORGANISMULUI UMAN

Microorganismele formează un procent mic, abia semnificativ din greutatea corpului uman (0.8–2 kg de bacterii vii), dar din punct de vedere numeric, bacteriile sunt net superioare (90%) față de celulele proprii (10%), iar numărul de gene în microbiotă este cu două ordine de mărime superior (99%) numărului de gene umane (1%) (Wexler, 2007).

Microbiota normală este reprezentată de populația de microorganisme asociată tegumentului și mucoaselor la indivizii normali (tabelul 1.). Deși organismele animale sunt sterile în cursul vieții intrauterine, imediat după naștere sunt colonizate progresiv de un număr mare de microorganisme, care se găsesc pe suprafața corpului și a diferitelor mucoase, în special pe traiectul digestiv. Numărul microorganismelor la omul adult este apreciat la 10^{14} celule, cu un ordin de mărime peste numărul total al celulelor organismului uman (10^{13}) (Dobzhansky, 1974), cea mai mare parte fiind localizate la nivelul tractului digestiv.

Microorganismele asociate organismului animal și uman pot aparține la două categorii majore:

1) Microbiota *normală* sau *rezidentă* sau *autohtonă* este reprezentată de microorganisme indigene asociate în mod constant cu o anumită zonă corporală, la o anumită vârstă. Asocierea organismelor superioare cu microorganismele a fost stabilită în cursul evoluției comune și sunt reprezentate de bacterii, microfungi și protozoare. Deși de la copiii sănătoși au fost izolate și cultivate mai multe virusuri, Reed și colab. (1974) consideră că în mod normal nu există virusuri asociate.

2) Microorganismele *tranzitorii* sau *străine* sau *alohtone* provin din mediul extern (aer, sol sau de la alte animale) sunt nepatogene sau potențial patogene și populează tegumentul pentru un interval limitat (ore, zile, săptămâni). Acestea nu contribuie semnificativ la activitatea microbiotei normale, la ale cărei condiții nu se pot adapta. Dacă microbiota rezidentă rămâne intactă, microorganismele alohtone nu sunt semnificative, dar dacă echilibrul microbiotei este alterat, cele tranzitorii se multiplică și pot iniția procese infecțioase.

O situație particulară o prezintă microbiota gastrointestinală. Un microorganism poate fi autohton pentru un anumit segment și alohton pentru altul pe care îl tranzitează după ce s-a desprins de habitatul său natural.

S-a calculat că organismul uman adult poartă 10^{12} bacterii pe tegument, 10^{10} în cavitatea bucală, și 10^{14} în tractul gastro-intestinal. Numărul speciilor de microorganisme care populează tegumentul și mucoasele este mult mai mare decât valorile furnizate prin metodele clasice de estimare a diversității bacteriene, deoarece dintre microorganismele care formează microbiota rezidentă și tranzitorie, numai o proporție mică se pot cultiva. Utilizarea tehnicilor moleculare, în special a amplificării ADNr 16S, a făcut posibilă identificarea unui număr mare de specii, în special în secrețiile vaginale.

Grupurile de microorganisme și speciile predominante întâlnite la nivelul diferitelor zone corporale nesterile sunt prezentate în tabelele 1 și 2.

Tabelul 1.

Grupuri de microorganisme întâlnite în microbiota diferitelor cavități la adult (Todar, 2009).

Zona anatomică	Microorganisme dominante în microbiota asociată
Piele	Stafilococi și corinebacterii
Conjunctivă	Coci Gram pozitivi și bacili Gram negativi
Cavitatea bucală	
Smalțul dentar	Streptococci, lactobacilli
Mucoasa cavității bucale	Streptococci și bacterii lactice
Tractul respirator superior	
Vestibul nazal	Stafilococi și corinebacterii
Faringe	Streptococci, neisserii, bacili Gram negativi și coci
Tractul respirator inferior	Steril

Tractul gastrointestinal	
Stomac	*H. pylori* (până la 50% dintre indivizi)
Intestin subțire	Bacterii lactice, coliformi, enterococi, bifidobacterii
Colon	*Bacteroides*, bacterii lactice, coliformi, enterococi, clostridii, bacterii metanogene.
Tractul urogenital	
Uretra anterioară	Stafilococi, corinebacterii, coliformi
Vagin	Bacterii lactice sau microbiotă mixtă

Tabelul 2.

Specii bacteriene predominante în microbiota normală la om (Todar, 2009).

SPECIA BACTERIANĂ	Piele	Conjunctivă	Vestibul nazal	Faringe	Cavitatea bucală	Intestin subțire	Uretra anterioară	Vagin
S. epidermidis	++	+	++	++	++	+	++	++
*S. aureus**	+	+/-	+	+	+	++	+/-	+
Str. mitis				+	++	+/-	+	+
Str. salivarius				++	++			
*Str. mutans**				+	++			
*Enterococcus faecalis**				+/-	+	++	+	+
*Str. pneumoniae**		+/-	+/-	+	+			+/-
*Str.pyogenes**	+/-	+/-		+	+	+/-		+/-
Neisseria sp.		+	+	++	+		+	+
*N. meningitidis**			+	++	+			+
Enterobacteriaceae (E. coli)*		+/-	+/-	+/-	+	++	+	+
Proteus sp.		+/-	+	+	+	+	+	+
*Ps. aeruginosa**				+/-	+/-	+	+/-	
*H. influenzae**		+/-	+	+	+			
*Bacteroides sp.**						++	+	+/-
Bifidobacterium bifidum						++		
Lactobacillus sp.				+	++	++		++
*Clostridium sp.**					+/-	++		
Cl. tetani						+/-		
Corynebacterii	++	+	++	+	+	+	+	+
Mycobacterii	+		+/-	+/-		+	+	
Actinomicete				+	+			
Spirochete				+	++	++		
Micoplasme				+	+	+	+/-	+

++ = 100 %; +=25 %; +/- = rare (5%); * = potențial patogene

3.1. Colonizarea şi succesiunea microorganismelor la organismul uman

Colonizarea microbiană a tuturor suprafețelor externe şi a unora interne ale organismului începe la naştere.

Fătul este steril *in utero*, dar se infectează în cursul trecerii prin vagin şi genitalele externe materne şi de la orice sursă din mediu, la care este expus.

În cursul procesului de colonizare, multe microorganisme contaminante mor şi dispar, deoarece nu se pot adapta. Totdeauna însă există unele specii-pionier care se stabilizează, aderă la diferite substraturi sau se divid cu o rată superioară celei a eliminării. La sugarul hrănit natural, primele bacterii care apar în sistemul digestiv aparțin genului *Lactobacillus*, urmat după 1–2 zile de *Bifidobacterium*, care devine predominant numeric. Ulterior se instalează alte specii facultativ anaerobe (*E. coli, S. faecalis*).

Modificarea majoră a microbiotei la toate animalele studiate este asociată cu tranziția la alimente solide, când apar bacterii strict anaerobe (*Bacteroides sp.*), în special în intestinul gros, iar numărul celor facultativ anaerobe scade progresiv.

Mecanismele colonizării sunt parțial cunoscute. Colonizarea trebuie să învingă sistemele de eliminare mucociliare (care îndepărtează bacteriile nelegate de epitelii), fluxul unidirecțional al lichidelor pe suprafața epiteliilor şi activitatea peristaltică (a tubului digestiv), rata de *turnover* a celulelor epiteliale senescente, sistemele imunitare locale (producerea de sIgA, producerea de lizozim, sinteza de analogi ai

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

receptorilor specifici, care se combină cu suprafețele de legare bacteriană, neutralizându-le capacitatea de aderență) (fig. 25), variațiile pH și ale potențialului redox, efectul antibacterian al bilei neconjugate, care explică numărul mic al bacteriilor din intestinul subțire, producerea de către gazdă, a unor proteine care leagă Fe, creând un deficit de Fe pentru bacterii, competiția cu alte microorganisme etc.

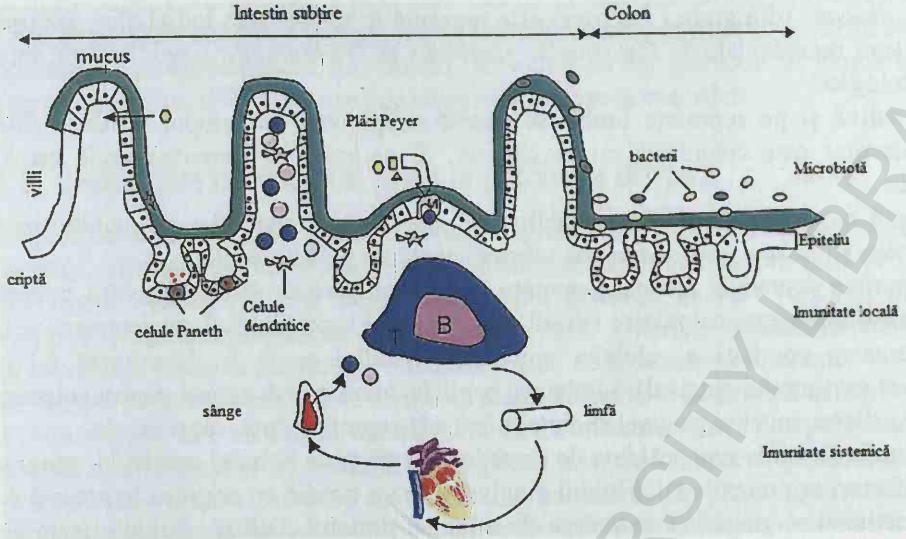


Fig. 25. Ilustrarea mecanismelor de apărare de la nivelul intestinului (după Orhage și Nord, 2000).

S-a semnalat existența unei anumite asemănări antigenice între suprafața celulei microbiene și mucusul sau mucoasa intestinală, în care ocupă un habitat.

Aderența are un caracter de specificitate, în sensul că epiteliile situate în diferite localizări anatomice leagă specii bacteriene diferite.

Aderența bacteriană este, de regulă, funcția adezinelor bacteriene, care se leagă de receptorii glicoproteici sau glicolipidici complementari de pe suprafața celulelor epiteliale ale gazdei.

3.2. Microbiota normală a tractului respirator și a cavității orale

Ecosistemul oral format din microorganisme și totalitatea suprafețelor pe care pot să adere, este influențat de 3 categorii de factori: ai gazdei, ai microorganismelor și externi.

Mucoasa orală și faringiană sunt sterile la naștere. La 4–12 ore după naștere, colonizarea cavității orale a nou născutului începe cu streptococi din grupul *viridans* (*S. mitis, S. oralis* și *S. salivarius*). Streptococii, probabil de origine maternă, devin dominanți și rămân astfel pentru toată viața. Ulterior, microorganismele se diversifică. Succesiunea se încheie când toate suprafețele au fost populate.

Curând după aceea, mucoasele sunt populate cu stafilococi, diplococi Gram negativi (*Neisseria* sp.,), difteroizi și lactobacili.

Pe mucoasa căilor respiratorii superioare (nări și nazofaringe), numărul microorganismelor este mic, fiind reprezentate de coci Gram pozitivi (*S. aureus* și specii coagulazo-negative, *Peptostreptococcus sp., Stomatococcus mucilaginosus, Gemella* sp.), *Corynebacterium sp., Fusobacterium sp.* Dintre cocii Gram negativi anaerobi cei mai frecvenți sunt speciile de *Veillonella sp.*

Prezența tranzitorie a unor microorganisme patogene (de exemplu, *S. pyogenes* care produce faringita streptococică) este frecvent întâlnită.

În nazofaringe, populația de microorganisme este mai complexă: predomină speciile de *Streptococcus* și *Neisseria* (streptococii α-hemolitici și 12 specii de *Neisseria*). Colonizarea cu *N. meningitidis* atinge valori mari (până la 95%) la adulții tineri din aglomerările umane.

În căile respiratorii medii (orofaringe și tonsile) predomină cocii Gram pozitivi și cei Gram negativi. Bacilii Gram pozitivi din microbiota orofaringelui sunt speciile de *Actinomyces sp., Actinobacillus sp., Corynebacterium sp., Lactobacillus sp., Propionibacterium sp.. Actinobacillus actinomycetemcomitans* este cauza periodontitei juvenile.

BOTANICAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacilii Gram negativi anaerobi din orofaringe sunt *Fusobacterium sp., Bacteroides sp., Porphyromonas sp., Prevotella sp., Selenomonas sp., Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae*. Cei anaerobi depăşesc pe cei aerobi în proporţie de 100/1. Căile respiratorii inferioare (laringe, trahee, bronhii şi plamâni) sunt sterile.

C. albicans (din grupul fungilor) este prezentă la majoritatea indivizilor, iar protozoarele din orofaringe sunt reprezentate de *Entamoeba gingivalis* şi *Trichomonas tenax,* nefiind însă implicate în procese patologice.

În salivă şi pe suprafaţa limbii se găsesc streptococi din grupul viridans *(Str. salivarius)*. Suprafaţa dinţilor este colonizată cu *S. sanguis, S. mutans*, iar mucoasa orală cu *S. vestibularis* şi *S. sanguis*.

Odată cu erupţia dentară, se stabilizează spirochetele anaerobe, *Prevotella melaninogenica, Fusobacterium* sp., *Capnocytophaga* sp., vibrioni anaerobi şi lactobacili.

Suprafaţa dentară şi mucoasa cavităţii orale sunt habitate distincte pentru microbiota cavităţii orale. Dintele oferă pentru colonizare situsul subgingival şi supragingival, iar mucoasa se caracterizează prin descuamarea continuă a celulelor epiteliale. Epiteliul poate fi cheratinizat (al palatului) sau necheratinizat (al şanţului gingival). Limba, cu papilele, oferă o nişă optimă pentru colonizare, iar şanţul gingival (aria dintre epiteliul gingival şi dinte) oferă atât suprafaţă dură, cât şi moale.

Suprafeţele orale sunt scăldate de secreţia salivară şi de lichidul crevicular gingival, care oferă nutrienţi şi factori antimicrobieni. Fluidul gingival este un exudat cu originea în plasmă care trece prin epiteliul joncţional al gingiei şi se scurge de-a lungul dintelui. Difuzia fluidului este lentă în gingia sănătoasă, dar rata creşte în gingia inflamată. Compoziţia fluidului este asemănătoare cu aceea a plasmei: conţine proteine serice, albumină, leucocite, imunoglobuline, complement.

Mediul supragingival al cavităţii orale este controlat în primul rând de secreţia salivară. Saliva conţine factori de apărare nespecifică: sIgA (Ig A din secreţii), mucine, glicoproteine, lactoferină, lizozim, peroxidază, histatine, cistatine.

sIgA reprezintă izotipul dominant al imunoglobulinelor în secreţia salivară şi are un rol major în reacţiile de apărare, fiind prima linie de apărare faţă de agenţii patogeni care tind să colonizeze sau să invadeze suprafeţele organismului gazdă. sIgA reacţionează cu diferite antigene ale microbiotei salivare. Totuşi, bacteriile indigene supravieţuiesc în cavitatea orală, deoarece sunt mai puţin sensibile sau evită mecanismele imunitare.

Mucinele, principalul component organic al secreţiilor mucoase, sunt glicoproteine cu greutate moleculară mare produse de glandele salivare submandibulare, sublinguale şi de numeroasele glande salivare mici. Ele au rol protector pentru suprafeţele dure şi moi.

Mucinele şi glicoproteinele adsorbite pe suprafaţa dintelui favorizează aderenţa bacteriană, iar când sunt libere în salivă se pot lega cu adezinele bacteriene sau produc chiar aglutinarea bacteriilor.

Lizozimul este o proteină cationică mică prezentă în toate fluidele corpului, secretată de celulele ductale intercalate. Acţiunea sa constă în hidroliza legăturilor glicozidice ale peptidoglicanului parietal.

Lactoferina este o glicoproteină care leagă Fe, produsă de celulele ductale intercalate. Inhibă creşterea microbiană, probabil prin sechestrarea Fe în mediu.

Peroxidaza salivară, secretată de celulele acinare ale glandelor salivare, este o componentă a sistemului antimicrobian care implică oxidarea tiocianatului salivar la hipotiocianat şi a H_2O_2 de origine bacteriană şi diminuează producerea acidului în placa dentară.

Histatinele (peptide bogate în His) sunt o familie de peptide bazice mici produse de celulele acinare. Inhibă dezvoltarea *C. albicans* la forma infecţioasă.

Cistatinele (fosfoproteine bogate în Cys) sunt secretate de celulele acinare. Se găsesc şi în plasmă şi pot ajunge în cavitatea orală pe calea fluidului crevicular. Cistatinele acţionează ca inhibitori ai tiol-proteazelor şi inhibă proteazele produse de bacteriile plăcii dentare.

Şanţul gingival rămâne controlat numai de fluidul crevicular şi de componentele sale, deoarece saliva nu are acces. Componentele celulare şi humorale ale sângelui pot ajunge în şanţul gingival prin trecerea, la nivelul epiteliului gingival, în fluidul gingival. Curgerea fluidului se amplifică mult în starea patologică a gingiei.

Lichidul gingival conține IgM, IgA, complement, leucocite, cu acțiune protectoare față de invazia microbiană.

Leucocitele fluidului gingival sunt reprezentate de polimorfonucleare (90%), restul fiind mononucleare. Majoritatea mononuclearelor (60%) sunt limfocite B, 20–30% sunt limfocite T și 10–15% sunt macrofage. Polimorfonuclearele sunt viabile și capabile de fagocitoză. Probabil rămân viabile la o mică distanță de marginea gingiei, dar se lizează osmotic imediat ce ajung în salivă.

Componentele *complementului* din fluidul crevicular au rol protector în gingia sănătoasă. În inflamația gingiei, apar C3a, C3b, C5a, ceea ce sugerează activarea cascadei.

3.2.1. Implicațiile microbiotei orale în patologia dentară

Microbiota cavității orale este asociată cu două maladii orale: *formarea cariilor* și *periodontita*.

Caria este rezultatul dezintegrării țesutului dentar de la suprafață spre interior. Într-o primă etapă, smaltul dentar (necelular) este demineralizat sub acțiunea acizilor rezultați din procesele fermentative ale bacteriilor componente ale plăcii dentare. Ulterior, descompunerea dentinei și cementului se datorează digestiei matricei proteice catalizată de proteazele bacteriene.

Prima treaptă în apariția cariei este formarea *plăcii bacteriene* pe smaltul dentar.

Suprafața dentară este un mediu natural populat de un număr mare de specii bacteriene, care formează un biofilm stratificat și compact denumit *placă dentară*. Numărul speciilor bacteriene din placa dentară este foarte mare: circa 60% dintre speciile bacteriene ale plăcii au fost identificate prin *cultivare*, iar restul prin metode *moleculare*. Estimările diversității bacteriene în cavitatea orală, bazate pe metodele clasice de cultivare, indică existența a peste 500 de specii (509 specii izolate din plăcile a 300 de pacienți). Metodele moderne de biologie moleculară (PCR) au permis identificarea multor specii necultivabile.

Majoritatea microorganismelor (MO) persistă în mediile naturale, nu ca organisme libere, ci atașate de suprafețe, într-o *peliculă* (*biofilm*), care formează un ecosistem prin diversitatea componentelor celulare și complexitatea proceselor metabolice.

Bacteriile se asociază și se atașează succesiv la bacteriile biofilmului timpuriu, datorită unui proces de recunoaștere între specii distincte genetic, denumit *coagregare*. Bacteriile diferite genetic pot să adere prin intermediul adezinelor. Adezinele recunosc receptori proteici, glicoproteici sau polizaharidici existenți pe suprafețele orale și pe alte tipuri de celule bacteriene.

Placa dentară, ca orice biofilm, este alcătuită din celule și matrice (fig. 26). Matricea constă dintr-un amestec de polizaharide (PZ) extracelulare cu greutate moleculară mare, glicoproteine salivare, acizi nucleici, ioni de Ca și P. Cele mai multe bacterii produc PZ, fie sub forma unei capsule, fie a unui glicocalix.

Formarea plăcii dentare. Aproape imediat după periajul dentar, pe suprafețele expuse ale smaltului dentar se formează o *peliculă proteică* formată din albumină, lizozim, glicoproteine, lipide, fosfoproteine, fluidul sulcului gingival. Într-un interval de ordinul orelor după formarea peliculei, coci și bacili Gram pozitivi din microbiota normală orală colonizează aceste suprafețe: *Str. mutans, Str. salivarius*, actinomicete și mai puțin *Haemophilus sp.*. Colonizatorii inițiali ai plăcii sunt streptococii, dar în câteva zile comunitatea este dominată de *Actinomyces sp.*. Streptococii reprezintă 60-90% dintre bacteriile care colonizează smaltul dentar în primele 4 ore după periaj. Streptococii produc glucani extracelulari, prin intermediul cărora aderă la pelicula proteică dentară. Bacteriile colonizatoare primare coagregă numai cu un set de colonizatori timpurii (*Actinomyces sp., Capnocytophaga sp., Eikenella sp., Haemophillus sp., Prevotella sp., Propionibacterium sp., Veillonella*) și în general nu coagregă cu colonizatorii tardivi (*Treponema denticola, Porphyromonas gingivalis*). După câteva zile, predomină actinomicetele producătoare de proteaze și începe să se dezvolte matricea caracteristică a biofilmului. Puntea de legătură între cele două categorii de colonizatori este *F. nucleatum*, ceea ce explică abundența sa numerică în probele normale și patologice. Odată cu scăderea potențialului redox al plăcii devin dominante speciile microaerofile și moderat anaerobe. Speciile microaerofile din constituția plăcii dentare sunt reprezentate de: *A. actinomycetemcomitans, Campylobacter rectus, Eikenella corrodens,* iar speciile anaerobe de: *P. gingivalis, B. forsythus, T. denticola, P. intermedia, F. nucleatum, Eubacterium* sp.

Bacilii Gram negativi anaerobi din orofaringe sunt *Fusobacterium sp., Bacteroides sp., Porphyromonas sp., Prevotella sp., Selenomonas sp., Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae*. Cei anaerobi depăşesc pe cei aerobi în proporţie de 100/1. Căile respiratorii inferioare (laringe, trahee, bronhii şi plamâni) sunt sterile.

C. albicans (din grupul fungilor) este prezentă la majoritatea indivizilor, iar protozoarele din orofaringe sunt reprezentate de *Entamoeba gingivalis* şi *Trichomonas tenax,* nefiind însă implicate în procese patologice.

În salivă şi pe suprafaţa limbii se găsesc streptococi din grupul viridans *(Str. salivarius)*. Suprafaţa dinţilor este colonizată cu *S. sanguis, S. mutans*, iar mucoasa orală cu *S. vestibularis* şi *S. sanguis*.

Odată cu erupţia dentară, se stabilizează spirochetele anaerobe, *Prevotella melaninogenica, Fusobacterium* sp., *Capnocytophaga* sp., vibrioni anaerobi şi lactobacili.

Suprafaţa dentară şi mucoasa cavităţii orale sunt habitate distincte pentru microbiota cavităţii orale. Dintele oferă pentru colonizare situsul subgingival şi supragingival, iar mucoasa se caracterizează prin descuamarea continuă a celulelor epiteliale. Epiteliul poate fi cheratinizat (al palatului) sau necheratinizat (al şanţului gingival). Limba, cu papilele, oferă o nişă optimă pentru colonizare, iar şanţul gingival (aria dintre epiteliul gingival şi dinte) oferă atât suprafaţă dură, cât şi moale.

Suprafeţele orale sunt scăldate de secreţia salivară şi de lichidul crevicular gingival, care oferă nutrienţi şi factori antimicrobieni. Fluidul gingival este un exudat cu originea în plasmă care trece prin epiteliul joncţional al gingiei şi se scurge de-a lungul dintelui. Difuzia fluidului este lentă în gingia sănătoasă, dar rata creşte în gingia inflamată. Compoziţia fluidului este asemănătoare cu aceea a plasmei: conţine proteine serice, albumină, leucocite, imunoglobuline, complement.

Mediul supragingival al cavităţii orale este controlat în primul rând de secreţia salivară. Saliva conţine factori de apărare nespecifică: sIgA (Ig A din secreţii), mucine, glicoproteine, lactoferină, lizozim, peroxidază, histatine, cistatine.

sIgA reprezintă izotipul dominant al imunoglobulinelor în secreţia salivară şi are un rol major în reacţiile de apărare, fiind prima linie de apărare faţă de agenţii patogeni care tind să colonizeze sau să invadeze suprafeţele organismului gazdă. sIgA reacţionează cu diferite antigene ale microbiotei salivare. Totuşi, bacteriile indigene supravieţuiesc în cavitatea orală, deoarece sunt mai puţin sensibile sau evită mecanismele imunitare.

Mucinele, principalul component organic al secreţiilor mucoase, sunt glicoproteine cu greutate moleculară mare produse de glandele salivare submandibulare, sublinguale şi de numeroasele glande salivare mici. Ele au rol protector pentru suprafeţele dure şi moi.

Mucinele şi glicoproteinele adsorbite pe suprafaţa dintelui favorizează aderenţa bacteriană, iar când sunt libere în salivă se pot lega cu adezinele bacteriene sau produc chiar aglutinarea bacteriilor.

Lizozimul este o proteină cationică mică prezentă în toate fluidele corpului, secretată de celulele ductale intercalate. Acţiunea sa constă în hidroliza legăturilor glicozidice ale peptidoglicanului parietal.

Lactoferina este o glicoproteină care leagă Fe, produsă de celulele ductale intercalate. Inhibă creşterea microbiană, probabil prin sechestrarea Fe în mediu.

Peroxidaza salivară, secretată de celulele acinare ale glandelor salivare, este o componentă a sistemului antimicrobian care implică oxidarea tiocianatului salivar la hipotiocianat şi a H_2O_2 de origine bacteriană şi diminuează producerea acidului în placa dentară.

Histatinele (peptide bogate în His) sunt o familie de peptide bazice mici produse de celulele acinare. Inhibă dezvoltarea *C. albicans* la forma infecţioasă.

Cistatinele (fosfoproteine bogate în Cys) sunt secretate de celulele acinare. Se găsesc şi în plasmă şi pot ajunge în cavitatea orală pe calea fluidului crevicular. Cistatinele acţionează ca inhibitori ai tiol-proteazelor şi inhibă proteazele produse de bacteriile plăcii dentare.

Şanţul gingival rămâne controlat numai de fluidul crevicular şi de componentele sale, deoarece saliva nu are acces. Componentele celulare şi humorale ale sângelui pot ajunge în şanţul gingival prin trecerea, la nivelul epiteliului gingival, în fluidul gingival. Curgerea fluidului se amplifică mult în starea patologică a gingiei.

Lichidul gingival conține IgM, IgA, complement, leucocite, cu acțiune protectoare față de invazia microbiană.

Leucocitele fluidului gingival sunt reprezentate de polimorfonucleare (90%), restul fiind mononucleare. Majoritatea mononuclearelor (60%) sunt limfocite B, 20–30% sunt limfocite T și 10–15% sunt macrofage. Polimorfonuclearele sunt viabile și capabile de fagocitoză. Probabil rămân viabile la o mică distanță de marginea gingiei, dar se lizează osmotic imediat ce ajung în salivă.

Componentele *complementului* din fluidul crevicular au rol protector în gingia sănătoasă. În inflamația gingiei, apar C3a, C3b, C5a, ceea ce sugerează activarea cascadei.

3.2.1. Implicațiile microbiotei orale în patologia dentară

Microbiota cavității orale este asociată cu două maladii orale: *formarea cariilor* și *periodontita.*

Caria este rezultatul dezintegrării țesutului dentar de la suprafață spre interior. Într-o primă etapă, smaltul dentar (necelular) este demineralizat sub acțiunea acizilor rezultați din procesele fermentative ale bacteriilor componente ale plăcii dentare. Ulterior, descompunerea dentinei și cementului se datorează digestiei matricei proteice catalizată de proteazele bacteriene.

Prima treaptă în apariția cariei este formarea *plăcii bacteriene* pe smaltul dentar.

Suprafața dentară este un mediu natural populat de un număr mare de specii bacteriene, care formează un biofilm stratificat și compact denumit *placă dentară*. Numărul speciilor bacteriene din placa dentară este foarte mare: circa 60% dintre speciile bacteriene ale plăcii au fost identificate prin *cultivare*, iar restul prin metode *moleculare*. Estimările diversității bacteriene în cavitatea orală, bazate pe metodele clasice de cultivare, indică existența a peste 500 de specii (509 specii izolate din plăcile a 300 de pacienți). Metodele moderne de biologie moleculară (PCR) au permis identificarea multor specii necultivabile.

Majoritatea microorganismelor (MO) persistă în mediile naturale, nu ca organisme libere, ci atașate de suprafețe, într-o *peliculă* (*biofilm*), care formează un ecosistem prin diversitatea componentelor celulare și complexitatea proceselor metabolice.

Bacteriile se asociază și se atașează succesiv la bacteriile biofilmului timpuriu, datorită unui proces de recunoaștere între specii distincte genetic, denumit *coagregare*. Bacteriile diferite genetic pot să adere prin intermediul adezinelor. Adezinele recunosc receptori proteici, glicoproteici sau polizaharidici existenți pe suprafețele orale și pe alte tipuri de celule bacteriene.

Placa dentară, ca orice biofilm, este alcătuită din celule și matrice (fig. 26). Matricea constă dintr-un amestec de polizaharide (PZ) extracelulare cu greutate moleculară mare, glicoproteine salivare, acizi nucleici, ioni de Ca și P. Cele mai multe bacterii produc PZ, fie sub forma unei capsule, fie a unui glicocalix.

Formarea plăcii dentare. Aproape imediat după periajul dentar, pe suprafețele expuse ale smaltului dentar se formează o *peliculă proteică* formată din albumină, lizozim, glicoproteine, lipide, fosfoproteine, fluidul sulcului gingival. Într-un interval de ordinul orelor după formarea peliculei, coci și bacili Gram pozitivi din microbiota normală orală colonizează aceste suprafețe: *Str. mutans, Str. salivarius*, actinomicete și mai puțin *Haemophilus sp.*. Colonizatorii inițiali ai plăcii sunt streptococii, dar în câteva zile comunitatea este dominată de *Actinomyces sp.*. Streptococii reprezintă 60-90% dintre bacteriile care colonizează smaltul dentar în primele 4 ore după periaj. Streptococii produc glucani extracelulari, prin intermediul cărora aderă la pelicula proteică dentară. Bacteriile colonizatoare primare coagregă numai cu un set de colonizatori timpurii (*Actinomyces sp., Capnocytophaga sp., Eikenella sp., Haemophillus sp., Prevotella sp., Propionibacterium sp., Veillonella*) și în general nu coagregă cu colonizatorii tardivi (*Treponema denticola, Porphyromonas gingivalis*). După câteva zile, predomină actinomicetele producătoare de proteaze și începe să se dezvolte matricea caracteristică a biofilmului. Puntea de legătură între cele două categorii de colonizatori este *F. nucleatum*, ceea ce explică abundența sa numerică în probele normale și patologice. Odată cu scăderea potențialului redox al plăcii devin dominante speciile microaerofile și moderat anaerobe. Speciile microaerofile din constituția plăcii dentare sunt reprezentate de: *A. actinomycetemcomitans, Campylobacter rectus, Eikenella corrodens,* iar speciile anaerobe de: *P. gingivalis, B. forsythus, T. denticola, P. intermedia, F. nucleatum, Eubacterium* sp.

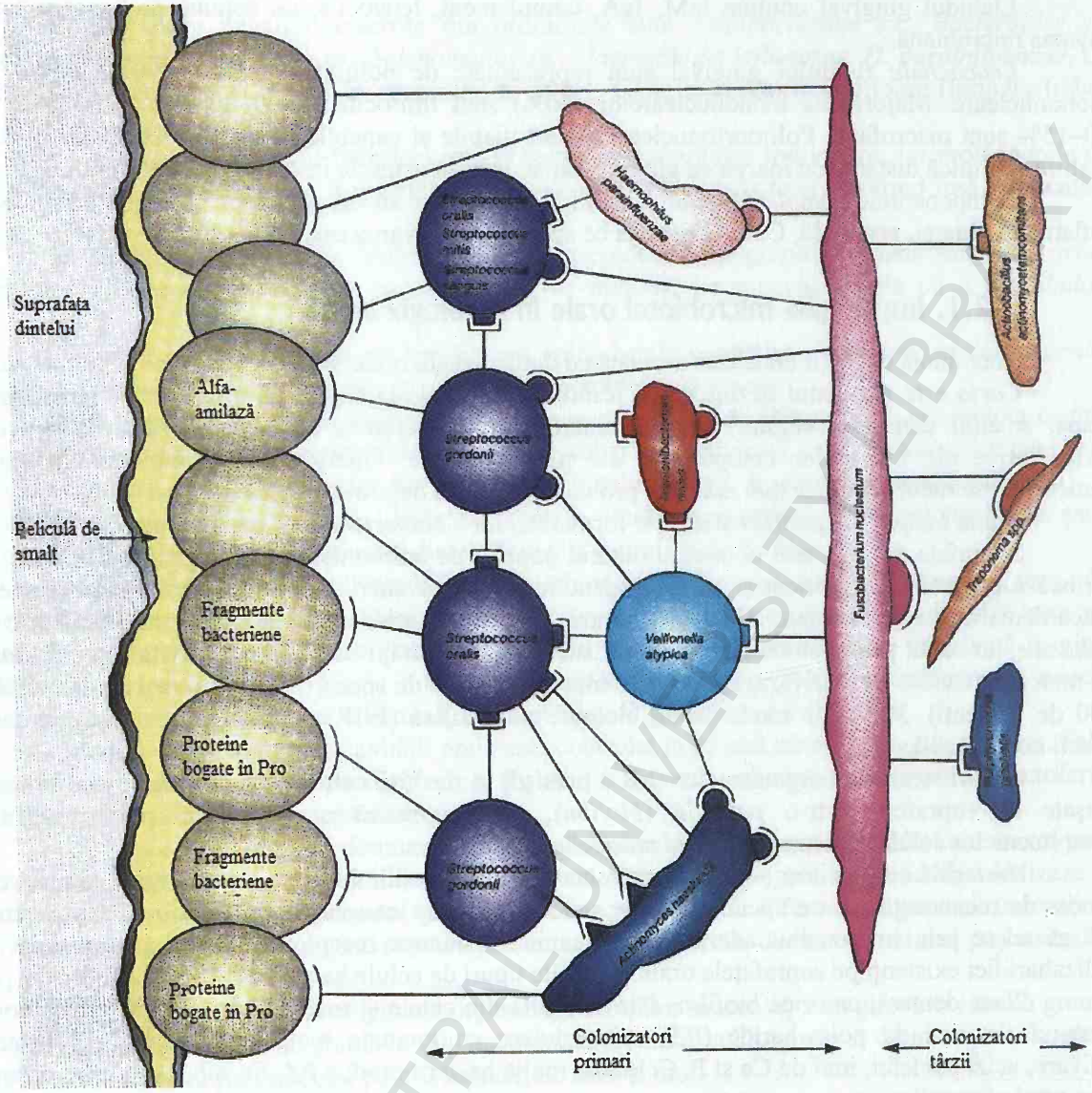


Fig. 26. Etapele colonizării smalțului dentar cu microorganisme și formării plăcii dentare (după Blatner, 2009).

Activitățile metabolice în interiorul plăcii sunt foarte complexe și adeseori complementare. De exemplu, *F. nucleatum* nu produce proteaze, dar *Porphyromonas gingivalis*, cu care coexistă, este foarte proteolitic.

În absența măsurilor de igienă orală, placa dentară se dezvoltă în 2–3 săptămâni, cu o grosime de 50–100 μm, pe suprafața dentară dar și în ariile protejate, inclusiv între dinți și în sulcul gingival (între rădăcina dintelui și epiteliul gingiei).

În interiorul plăcii dentare, celulele bacteriene sunt protejate, pentru că difuzia substanțelor antimicrobiene este foarte limitată, iar lizozimul salivar pătrunde tot mai greu.

Nutrienții pentru bacteriile plăcii pot avea origine salivară, alimentară sau sunt aduși de fluidul șanțului subgingival, un exudat seric ce scaldă șanțul gingival.

Datorită colonizării cu microorganisme, suprafața dentară devine anaerobă. Potențialul redox scade de la peste + 200 mv, la –30 mv în cursul primelor două zile de colonizare și ajunge la –150 mv după 7 zile. Proporția microorganismelor anaerobe crește odată cu vârsta biofilmului.

Saliva are rol în menținerea unui pH în jurul valorii neutre (6,7–7,3) prin două mecanisme: elimină glucidele și acizii rezultați din fermentație și are activitate de tampon a acidității (alimentare și bacteriene) prin bicarbonat. Treptat, datorită difuziei tot mai lente a salivei în placă, acizii produși se acumulează în interiorul plăcii și pH scade la valori acide.

BCU CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

În raport cu poziția față de marginea gingiei, se disting 2 tipuri de placă: *supragingivală* și *subgingivală.*

Placa supragingivală este dominată de bacterii din genurile *Streptococcus* și *Actinomycetes*, iar cea subgingivală este alcătuită din microbiota anaerobă Gram negativă, dominată de spirochete necultivabile.

Caria dentară este o maladie a țesutului dur al dintelui, caracterizată prin *dezintegrarea localizată, progresivă a structurii dentare*. Formarea cariei se datorează prezenței plăcii bacteriene pe suprafața coroanei dentare. Demineralizarea dintelui (smalț, dentină și cement) este consecința acțiunii acizilor organici produși de bacterii prin fermentarea glucidelor alimentare. Ingestia frecventă a glucidelor poate duce la selecția bacteriilor acidogene și acidurice (capabile să tolereze acidul), cu scăderea pH la 5-5,5, valoarea critică pentru demineralizare.

Placa bacteriană este o comunitate complexă și de aceea este greu de identificat agentul bacterian cariogen. Există dovezi că *S. mutans* și *Lactobacillus* sp. sunt implicate în inițierea și progresia cariei. Ambele fermentează rapid glucidele, cu producere de acizi, în special acid lactic și tolerează pH acid (fig. 27).

Periodontita. Pe măsură ce se dezvoltă în șanțul subgingival, bacteriile produc enzime proteolitice ce lizează direct țesutul sau interferă cu factorii apărării locale. Colagenaza și hialuronidaza degradează colagenul. Degradarea barierei fibrelor este urmată de lezarea structurilor de suport dentar.

Bacteriile Gram negative ale plăcii, după ce se lizează, eliberează endotoxină, care stimulează *inflamația.*

P. gingivalis, in vitro, poate invada celulele epiteliului gingival și are mecanisme invazive asemănătoare altor bacterii patogene invazive.

Periodontita este un proces inflamator al țesutului de sprijin al dintelui, prin care acesta se atașează la osul alveolar, ca răspuns la acumularea bacteriană pe suprafața dentară. Leziunile de periodontită se manifestă printr-un proces inflamator mediu și reversibil al gingiilor, până la distrugerea țesutului periodontal (gingie, ligament periodontal și a osului alveolar). Periodontita cronică poate duce la pierderea osului și migrarea apicală a epiteliului joncțional, cu formarea pungilor periodontale.

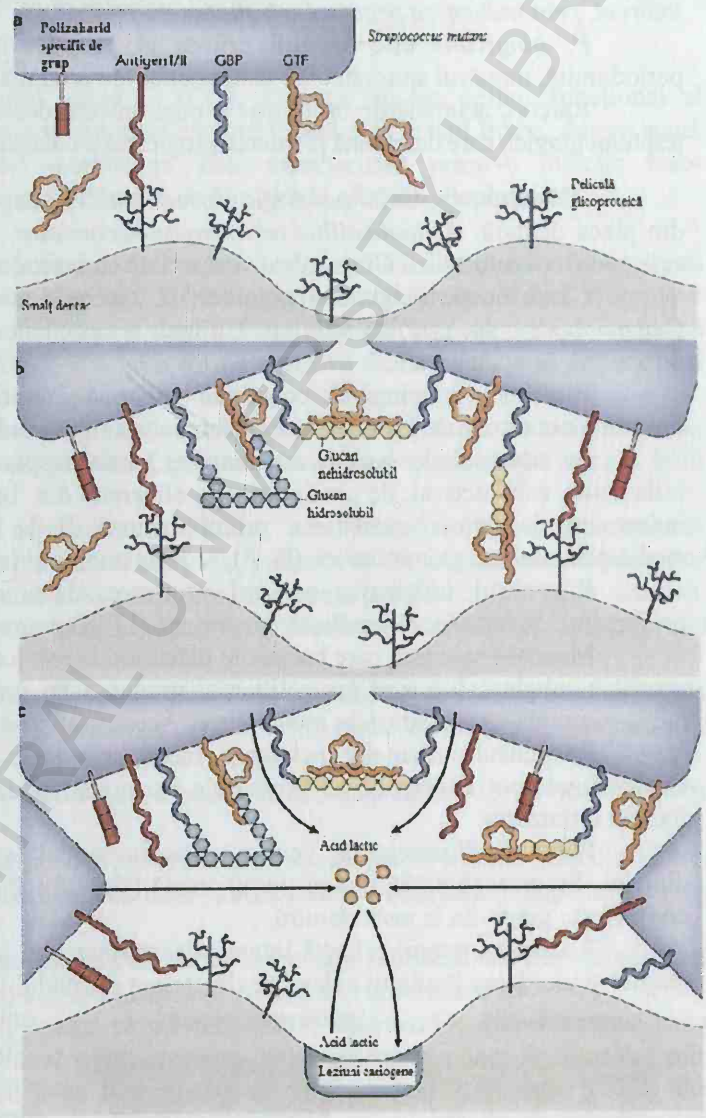


Fig. 27. Implicațiile metabolismului bacterian (*Str. mutans*) în geneza leziunilor cariogene (după Taubman și Nash, 2006). *Str. mutans* aderă la pelicula glicoproteică formată pe smaltul dentar prin intermediul mai multor tipuri de adezine (glucidele specifice de grup, adezina spteptococică sau Antigenul I/II, GTF (glucozil transferaze, enzime exprimate constitutiv de *Str. mutans*) si GBP (*glucan binding proteins*) (proteine care leagă glucanul). În prezența zaharozei, GTF sintetizează glucani extracelulari din glucoza rezultată alături de fructoză din scindarea zaharozei. *Str. mutans* aderă la acești glucani prin intermediul GTF și GBP, rezultând agregate bacteriene care prin metabolizarea glucidelor produc cantități mari de acid lactic, ce determină demineralizarea smaltului dentar, și în consecință, caria dentară.

ACTA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Canalul dintre rădăcina dintelui şi suprafaţa epiteliului gingiei se numeşte *şanţ subgingival* şi este situsul primar al infecţiei periodontale. Odată cu progresia maladiei, şanţul se va adânci într-o *pungă periodontală,* care se poate extinde pe 4–12 mm şi poate să conţină o populaţie bacteriană de 10^7–10^9 celule.

De la pacienţii cu maladie periodontală moderată s-au izolat: *Fusobacterium nucleatum, Peptostreptococcus micros, Eubacterium timidum, Lactobacillus sp, Actinomyces naeslundii, Ps. anaerobius, Eubacterium sp., Bacteroides intermedius, Fusobacterium sp., Selenomonas sputigena, Haemophilus aphrophilus*. Bacteriile rareori invadează ţesuturile, dar eliberează substanţe care pătrund în gingie şi produc *distrugerea directă a ţesutului sub acţiunea enzimelor şi endotoxinelor* sau *indirect, prin inducerea procesului inflamator.*

P. gingivalis este agentul primar al periodontitei. În placa gingivală a pacienţilor cu periodontită, numărul spirochetelor şi al cocilor are tendinţa de creştere.

Rareori, acumulările bacteriene produc infecţii deschise, dar stimulează răspunsul inflamator al ţesutului gingiei, care determină pierderea progresivă a colagenului ce ancorează dintele de osul alveolar.

Evoluţia procesului patologic periodontal. Boala periodontală (BP) este produsă de bacteriile din placa dentară. *Actinobacillus actinomycetemcomitans, P. gingivalis, Bacteroides forsythum* sunt cele mai frecvente specii Gram negative asociate cu periodontita.

Când începe sângerarea gingiilor, *A. viscosus* are o pondere importantă şi deja au apărut *Campylobacter* sp. şi *Prevotella* sp. Ultimele 2 specii necesită factori nutritivi ai gazdei (hemina), disponibili prin sângerare.

Biofilmele subgingivale constituie o enormă şi continuă încărcătură bacteriană. Ele sunt rezervoare continue de LPS, cu acces direct la ţesutul periodontal şi fluxul sanguin.

La acumulările bacteriene dentare, gazda răspunde prin *reacţie inflamatorie*. Răspunsul inflamator este activat de *endotoxinele* eliberate din bacteriile Gram negative, cele mai bune inductoare ale sintezei *citokinelor* proinflamatorii: IL-1, IL-6 şi TNF. Acestea induc sinteza altor mediatori: citokine chimiotactice (IL-8), prostaglandine şi leucotriene.

Răspunsul inflamator are rol protector, deoarece împiedică diseminarea bacteriilor în profunzime, îndepărtează produsele bacteriene (LPS, enzime) şi se sintetizează anticorpi.

Mecanismele prin care bacteriile plăcii induc reacţia inflamatorie sunt nespecifice. Majoritatea speciilor subgingivale sunt proteolitice şi produc acizi graşi (butirat, propionat, izobutirat), H_2S şi metil-mercaptan, ca produşi de metabolism. Aceşti compuşi sunt citotoxici pentru ţesutul gingival.

Răspunsul inflamator activează metaloproteazele matriceale, care hidrolizează colagenul. Colagenazele pot fi activate de proteazele bacteriene şi de intermediarii reducerii parţiale a O_2 din focarul inflamator.

Pierderea ligamentului dentar adânceşte sulcul (şanţul) dintre ţesutul gingival şi rădăcina dintelui. Se creează astfel punga periodontală (fig. 28). Pierderea parţială a ligamentului de ataşare converteşte gingivita la *periodontită.*

Adâncirea pungii reflectă intensitatea răspunsului inflamator, care cauzează edemul ţesutului gingiei şi pierderea ţesutului colagenic de ataşare a dintelui la osul alveolar. Cu cât este mai adâncă, cu atât punga este mai inaccesibilă igienei orale. Numărul bacteriilor rămâne relativ constant: creşterea lentă este echilibrată de desprinderile de la suprafaţa plăcii, odată cu fluidul sulcului gingival. În gingia inflamată, fluxul sanguin este stimulat, creşte numărul de neutrofile în fluidul sulcului gingival şi de mononucleare în epiteliu, creşte nivelul IgG şi IgA faţă de antigenele bacteriene, creşte rata de turnover a epiteliului gingival. Vascularizaţia abundentă a ţesutului gingival este un mecanism de apărare, deoarece este o barieră oxidativă faţă de microbiota anaerobă a plăcii.

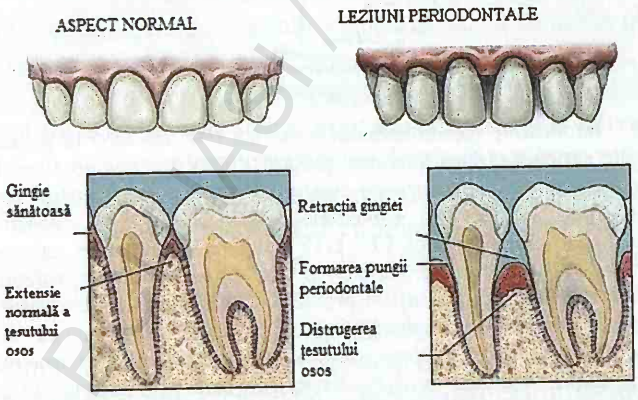


Fig. 28. Reprezentarea schematică a proceselor patologice periodontale (după Curtis, 2009).

Factorii care determină constricția arteriolelor periferice, ca fumatul şi stressul, sunt factori de risc pentru BP, deoarece reducerea fluxului sanguin permite o mai bună supraviețuire a bacteriilor anaerobe, iar produsele lor activează colagenazele interstițiale. Fumatul este un factor major de risc pentru periodontită şi este asociat cu prevalența crescută a lui *B. forsythus* şi *P. gingivalis*.

Mecanismele de apărare sunt favorabile gazdei, singurul aspect defavorabil fiind pierderea lentă a țesutului colagenic de ancorare a dintelui. La un număr mic de pacienți, deteriorarea este foarte rapidă, la o vârstă timpurie şi este favorizată de factori genetici predispozanți: neutrofilele şi/sau monocitele au disfuncții chimiotactice.

Una dintre clasificările bolii periodontale identifică următoarele forme:

- *gingivita,* fără pierderea țesutului de ancorare dentară;
- *periodontita adultului;*
- *periodontita timpurie* (la pacienți între 14–35 de ani);
- *gingivita ulcerativă necrozantă acută (ANUG)*, asociată cu un deficit funcțional al neutrofilelor. Apare la persoane tinere şi se caracterizează prin atacul brusc, durere acută şi necroza țesutului (papilei) interdentar. Este caracterizată printr-o infecție fuso-spirochetală (*Treponema vincenti*), descrisă de Vincent la sfârşitul secolului 19.

Controlul plăcii. Prevalența bolii periodontale creşte cu vârsta: 50% dintre indivizii adulți au gingivită (inflamația gingiei fără pierderea dinților); 30% au periodontită (definită prin prezența a 3–4 dinți cu pungi de cel puțin 4 mm). Un procent de 5–15% dintre cei cu periodontită au formă avansată cu pungi de cel puțin 6 mm. Alți 3–4% au o formă agresivă de BP, denumită periodontită timpurie, care se manifestă între 14–35 de ani.

Sângerarea gingivală şi pierderea progresivă a țesutului de ancorare, asociate procesului inflamator sunt nedureroase şi ignorate de pacient. Lipsa simptomelor este o caracteristică a bolii periodontale.

Infecțiile cu microorganismele organizate în biofilm sunt rareori eradicate de sistemul imunitar al gazdei. Bacteriile din biofilm eliberează antigene, inductoare ale sintezei anticorpilor, dar sunt rezistente la aceste mecanisme de apărare. Sistemul imunitar poate produce chiar leziuni tisulare. De aceea, tratamentul infecțiilor cu microorganisme organizate în biofilme necesită abordarea unor noi strategii.

În majoritatea cazurilor simptomele clinice ale plăcii sunt asociate cu creşterea preponderentă a câtorva specii anaerobe: *P. gingivalis, B. forsythus, T. denticola*, în placa subgingivală. Metodele de tratament se bazează pe ideea că boala periodontală este o infecție.

Bacteriile din placă pot fi de 1000 de ori mai rezistente la acțiunea antibioticelor decât aceleaşi organisme libere în suspensie.

Terapia cu antibiotice sau cu agenți antibacterieni de sinteză poate elimina formele libere, planctonice, dar celulele aderate de suportul viu sau inert rămân viabile în biofilm şi după terminarea terapiei continuă să se dividă.

Orice condiție care diminuează eficiența mecanismelor de apărare antibacteriană (imunodeficiență primară sau secundară, diabetul, disfuncții ale neutrofilelor), predispune la periodontită.

Tratamentul tradițional la BP sugerează că periodontita se datorează creşterii nespecifice a bacteriilor pe suprafața dentară şi că gradul de dezvoltare a plăcii dentare poate fi controlat prin curățire periodică. Dacă acumulările nu sunt îndepărtate, diferite produse bacteriene (LPS, alte antigene, enzime) stimulează răspunsul inflamator al gingiei. Placa se calcifică şi formează *calcul dentar* (tartru), sub marginea gingiei. În pungile mai mari de 5 mm, îndepărtarea plăcii necesită o cale chirurgicală de acces. După îndepărtarea plăcii, gradul inflamației diminuă. Curățirea dentară se recomandă la fiecare 3–6 luni.

Tratamentul clasic, bazat pe ipoteza plăcii nespecifice se face prin metode care au în vedere stadiul de evoluție a procesului inflamator: *gingivita* se tratează prin îndepărtarea mecanică a plăcii, iar *periodontita*, cu agenți antimicrobieni cu spectru larg (*tetraciclina*) sau cu o combinație de agenți ca *amoxicilina* şi *metronidazolul*. S-au utilizat de asemenea, penicilina V, ampicilina, augmentinul, eritromicina, cefalexina. Este imposibilă însă găsirea unui antibiotic care să inhibe creşterea celor peste 500 de specii care cresc pe suprafața dentară.

Clătirea cu *clorhexidină* după curățirea mecanică ameliorează semnificativ starea gingiilor.

ANUG se poate controla prin spălări cu agenți oxidanți (iod, H_2O_2) sau cu penicilină administrată sistemic.

Factorii de risc pentru periodontită sunt în același timp, factori de risc pentru maladii sistemice, cum sunt boala cardiovasculară: fumatul, stresul, îmbătrânirea, rasa, sexul masculin.

3.3. Habitatele microbiotei gastrointestinale

Ecosistemul gastrointestinal este complex, deschis, integrat și format din cele mai multe habitate pentru microorganisme, fiecare fiind colonizat de mai multe specii de microorganisme autohtone (tabelul 3, fig. 29).

Tabel 3.

Compoziția microbiotei orofaringiene și gastro-intestinale (după Orhage și Nord, 2000).

	Număr de microorganisme (UFC/ml sau UFC/g)				
Microorganisme	orofaringe	stomac	jejun	ileon	colon
Număr total	10^8 - 10^{10}	0 - 10^4	0 - 10^5	10^4 - 10^8	10^{10} - 10^{12}
Microorganisme aerobe					
Streptococcus	10^6 - 10^8	0 - 10^3	0 - 10^4	10^2 - 10^4	10^3 - 10^5
Enterococcus	rare	rare	0 - 10^2	10^2 - 10^4	10^5 - 10^{10}
Staphylococcus	0 - 10^2	0 - 10^2	0 - 10^3	10^2 - 10^5	10^4 - 10^6
Enterobacteria	rare	0 - 10^2	0 - 10^3	10^2 - 10^7	10^4 - 10^{10}
Fungi	0 - 10^3	0 - 10^2	0 - 10^2	10^2 - 10^4	10^2 - 10^5
Bacterii anaerobe					
Peptostreptococcus	10^4 - 10^6	0 - 10^3	0 - 10^3	10^2 - 10^6	10^{10} - 10^{12}
Bifidobacterium	0 - 10^2	0 - 10^2	0 - 10^4	10^3 - 10^9	10^8 - 10^{11}
Lactobacillus	0 - 10^3	0 - 10^3	0 - 10^4	10^2 - 10^5	10^6 - 10^8
Clostridium	rare	rare	rare	10^2 - 10^4	10^6 - 10^9
Eubacterium	10^2 - 10^3	rare	rare	rare	10^9 - 10^{12}
Veillonella	10^3 - 10^8	0 - 10^2	0 - 10^3	10^2 - 10^4	10^3 - 10^6
Fusobacterium	10^4 - 10^8	0 - 10^2	0 - 10^3	10^3 - 10^4	10^6 - 10^8
Bacteroides fragilis	rare	rare	0 - 10^3	10^3 - 10^7	10^{10} - 10^{12}
Prevotella	10^6 - 10^8	0 - 10^2	10^2 - 10^4	10^3 - 10^4	10^4 - 10^5

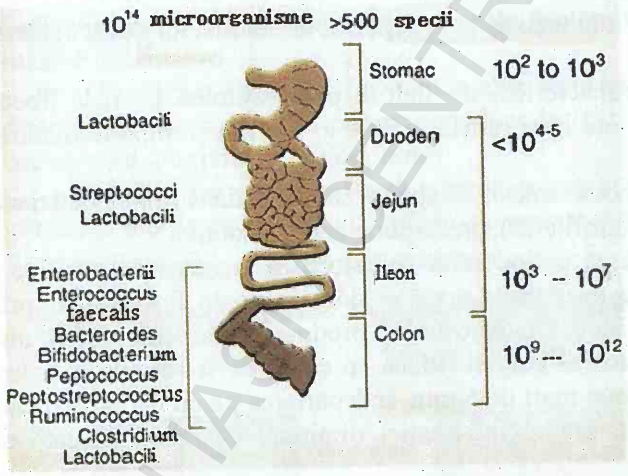


Fig. 29. Speciile predominante ale microbiotei în diferite etaje ale tractului gastro-intestinal (după Orhage și Nord, 2000).

Acestea pot avea trei localizări:

1) lumenul are calitatea de habitat în măsura în care microorganismele pot coloniza materialele prezente în el. Habitatul adevărat este reprezentat de suprafața particulelor de materiale solide, cum ar fi cele ale constituenților alimentari;

2) suprafața epitelială a diferitelor regiuni ale tubului digestiv;

3) criptele mucoaselor, prezente mai ales în intestinul subțire superior, cecum și colonul anumitor animale.

Microbiota gastrică. Stomacul este un compartiment ostil dezvoltării microorganismelor și de aceea este considerat steril, dar poate conține microorganisme ingerate odată cu alimentele sau cu apa. Acest fenomen este foarte accentuat la animalele coprofage (rozătoare, porc etc.) care ingeră cantități imense de microorganisme alohtone provenite din fecale.

Odată ajunse în stomac, marea majoritate a microorganismelor sunt distruse de aciditatea secreției gastrice. Microbiota este săracă (densitatea evaluată la 10^3–10^5 celule/gram), asociată cu

LIBRARY UNIVERSITY CENTRAL

suprafaţa epiteliului, fiind protejată de secreţia de mucus şi de bicarbonat. Bacteriile prezente sunt acidotolerante: *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* sp., *H. pylori*. Ultimul pare a fi implicat în producerea gastritei, a ulcerului gastric şi duodenal şi este asociat cu malignitatea gastrică.

Intestinul subţire oferă trei regiuni majore, cu conditii de mediu distincte, care influenţează dezvoltarea microbiotei: duoden, jejun şi ileon. În condiţii normale, microbiota este limitată la acest nivel (10^5 celule/ml) şi predomină lactobacilii şi enterococii anaerobi: *Lactobacillus sp., Enterococcus faecalis, Bifidobacterium sp., Bacteroides sp., Clostridium sp., Candida albicans,* unele derivate în mod cert din cavitatea bucofaringiană.

În ileon pot fi găsite bacterii provenite din colon. Dacă se produce obstrucţia tractului intestinal are loc staza, iar microbiota se aseamănă cu cea din colon (*Bifidobacterium sp., Bacteroides sp., Clostridium sp., E. coli, Enterococcus sp.*) şi duce la malabsorbţie.

Factorii limitanţi ai multiplicării bacteriilor în intestinul subţire sunt aciditatea gastrică, peristaltismul intestinal care asigură tranzitul relativ rapid spre intestinul gros şi existenţa unor substanţe care inhibă creşterea microorganismelor.

Microbiota intestinului gros. La om si la cele mai multe mamifere, microbiota acestui segment este alcătuită din câteva sute de specii bacteriene intolerante la O_2, dintre care puţine au fost cultivate *in vitro* şi identificate. În ceea ce priveşte densitatea celulelor, anaerobii predomină de circa 1000 de ori în raport cu bacteriile facultative. Microorganismele alohtone devin semnificative dacă densitatea lor depăşeşte 10^6 celule/g de conţinut intestinal. Ele provin din alimente sau din etajele superioare ale tractului digestiv.

La om, numărul bacteriilor strict anaerobe este de peste 10^{11} celule/g (30% din masa fecală), în care predomină *Bifidobacterium* sp., grupul *Bacteroides fragilis, Clostridium perfringens*, cocii anaerobi Gram pozitivi (*Peptostreptococcus, Enterococcus sp.*), în timp ce bacteriile facultativ aerobe reprezintă până la 4% din totalul speciilor (coliformii – 0,1–1%, proteae, pseudomonade, lactobacili, *Candida* etc.). Peste 100 de tipuri distincte cresc pe medii de cultură, însă numărul speciilor este evaluat la circa 500. În colonul normal nu se găsesc protozoare. Multe bacterii sunt aderente de celulele epiteliale ale mucoasei sau chiar inclavate între acestea.

Microorganismele gastrointestinale îndeplinesc funcţii nutriţionale cu importanţă diferită la rumegătoare şi la mamiferele monogastrice. La rumegătoare, rolul microorganismelor indigene este esenţial, în timp ce la animalele monogastrice şi la om, este mai curând accesoriu. Bacteriile intestinale sintetizează vitamina K, convertesc pigmenţii biliari în acizi biliari, degradează compuşii chimici rezistenţi la acţiunea enzimelor digestive şi au efect antagonic faţă de agenţii patogeni.

Microbiota colonului poate determina complicaţii severe, când integritatea barierei intestinale este compromisă (apendicite etc.). Bacteriile coliforme, originare în colon produc infecţii genito-urinare. NH_3 produs de bacterii prin dezaminarea aminoacizilor nedigeraţi este toxic. Efectul se manifestă atât asupra mucoasei colonului, generând leziuni ale acesteia, cât şi asupra ficatului. Microbiota ar putea fi implicată, direct sau indirect în geneza neoplaziei de colon. Incidenţa bolilor colonului, în general este mult redusă la populaţiile care consumă multe fibre vegetale, comparativ cu cele care au un regim bogat în grăsimi şi proteine.

Reacţiile Fenton. Radicalii liberi produşi de microbiota intestinală pot avea acţiune mutagenă şi genotoxică. Activitatea respiratorie a bacteriilor intestinale produce radicalul superoxid, care în prezenţa Fe, poate genera radicalul $OH^{\cdot}$.

Cea mai mare parte a Fe alimentar nu este absorbit, ci rămâne în intestin, la concentraţii calculate de peste 10 ori mai mari decât cele tisulare. Conţinutul intestinal are nivele crescute de pigmenţi biliari (bilirubină şi biliverdină), care leagă Fe (agenţi chelatori) într-o formă capabilă să favorizeze reacţiile Fenton ale radicalului superoxid:

$$O_2^{\cdot-} + Fe^{3+} \text{ ---- } O_2 + Fe^{2+}$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \text{ ---- } Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$$

S-a calculat că microbiota în conţinutul intestinal adiacent mucoasei colonului poate genera radicali $OH^{\cdot}$ liberi la o rată corespunzătoare celei produse de peste 10 000 razi de iradiere γ/zi.

Radicalii $OH^{\cdot}$ produşi prin reacţia Fenton sunt reactivi extrem de electrofili, ce pot reacţiona cu legăturile bazelor ADN şi pot scoate oxigenul din deoxiriboză. Această reacţie produce ruperi monocatenare de ADN, care dacă nu sunt reparate, produc mutaţii. Fe chelat este mai eficient decât cel nechelat, în producerea modificărilor bazelor ADN.

Fermentaţia în intestinul gros. La animalele adulte şi la om, în funcţie de cantitatea de alimente ingerate şi de natura lor, materialele ce nu pot fi degradate de enzimele acestora în stomac şi în intestin, sunt reţinute temporar în intestinul gros şi devin surse de energie utilizabile de microbiota

intestinului gros: la resturile alimentare nedigerate se adaugă macromolecule endogene aparţinând unor clase diferite de polizaharide ca, de exemplu, mucus gastrointestinal, imunoglobuline, acizi nucleici, constituenţi ai celulelor descuamate etc., precum şi unele glucide cu moleculă mică (stahioza din fasole etc.). O proporţie importantă a acestui material este sub formă insolubilă – fibrele vegetale formate din celuloză, hemiceluloze, xilan, particule de amidon rezistente la degradare, pectine. În plus, celulele mucoase ale glandelor epiteliului intestinal produc mucină insolubilă, abundentă, ce tapetează epiteliul intestinal şi uşurează tranzitul conţinutului.

Materialele particulate constituie suportul pe suprafaţa căruia comunităţile bacteriene se dezvoltă sub forma biofilmului aderent la substrat. Prelungirea intervalului de tranzit a acestui material oferă timpul necesar dezvoltării comunităţilor bacteriene specializate pentru degradarea materialului particulat.

Celuloza este adeseori o componentă importantă din punct de vedere cantitativ a materialului particulat şi hidroliza ei are impact energetic semnificativ asupra microbiotei intestinului gros. Hidroliza celulozei disponibilizează resurse energetice pentru toată comunitatea bacteriană. Organismele care hidrolizează celuloza se găsesc în microbiota intestinală a tuturor indivizilor umani, dar structura comunităţii în ceea ce priveşte speciile componente diferă în funcţie de statutul metanogenic al individului. La cei care nu produc CH_4 (lipsesc *Archaea*), bacteriile celulozolitice aparţin grupului *Bacteroides*, iar la cei care produc CH_4, speciile celulozolitice aparţin grupului *Firmacutes*.

Bacteriile celulozolitice trebuie să degradeze polizaharidele matricei (xilani, manani, pectine), pentru a avea acces la fibrele de celuloză. Produsele solubilizate devin disponibile altor membri ai comunităţii prin fenomenul hrănirii încrucişate (*cross-feeding*). Hrănirea încrucişată este ilustrată de competiţia pentru H_2 produs de bacteriile care degradează polizaharidele, între metanogene, acetogene şi sulfat-reducători în ecosistemele anaerobe.

La bolnavii cu deficienţă genetică a lactazei, aceasta devine disponibilă pentru fermentaţie în intestinul gros. Nu se ştie în ce măsură, în intestinul gros ajung componente ale cărnii ingerate. Hidroliza substanţelor complexe şi transportul produşilor rezultaţi, sunt catalizate de sisteme enzimatice bacteriene inductibile. Sinteza enzimelor hidrolitice este blocată prin represie sau activitatea lor este inhibată prin feed-back. Fermentaţia este asigurată de o comunitate complexă de bacterii care atacă hexozele cu producere de acizi graşi volatili (acetic, propionic, n-butiric, izobutiric, valeric, izovaleric şi caproic), metan, CO_2. O parte din acizii graşi rezultaţi în fermentaţie sunt absorbiţi prin peretele colonului, trec în sânge şi sunt metabolizaţi de organismul gazdei (Savage, 1986).

Unele microorganisme intestinale sintetizează în exces faţă de nevoile proprii, o serie de vitamine pe care le eliberează în lumenul intestinal (acid folic, piridoxină, biotină, acid pantotenic, riboflavină, vitamina K, vitamina B_{12}). Nu se ştie în ce măsură ele sunt preluate efectiv de organismul uman, deoarece sunt produse în special de organisme din cecum şi colon. Uneori, efectul este invers, de deficit de vitamina B_{12} pentru om, în urma consumării ei de către microorganismele intestinale. În plus, bacteriile se lizează şi eliberează în sistemul digestiv al mamiferelor, toate componentele celulare.

Unul dintre produşii azotaţi prezenţi în intestinul gros este *ureea*, unde ajunge prin difuzia din sângele capilarelor. Bacteriile o hidrolizează la CO_2 şi NH_3, ultimul fiind folosit pentru biosinteze.

În cursul fermentaţiei se produc cantităţi importante de gaze (CO_2, H_2, H_2S, CH_4), apreciate la 200-2000 ml/zi (Mallison, 1987). La circa 33% dintre indivizii umani, produsul major este metanul. O mare parte din H_2 şi CH_4 sunt absorbite în sânge şi sunt eliminate la nivel pulmonar. Producerea simultană de CH_4 şi H_2 este rară, deoarece H_2 este folosit pentru reducerea CO_2 la metan.

Microbiota normală grăbeşte tranzitul digestiv, care este mult mai lent la animalele *germ-free*, probabil ca rezultat al acţiunii sinergice a unor consţituenţi chimici sau fizici din alimentaţie şi a produşilor finali de metabolism bacterian, asupra proceselor de neurotransmitere la muşchii netezi.

Sistemul ecologic microbiotă/intestin poate fi perturbat prin: a) administrarea unor substanţe antibiotice care distrug microorganismele sensibile creând disbioze; b) infecţii sau alte boli ale sistemului.

Microbiota normală influenţează rata de turnover a enterocitelor. Rata înlocuirii acestor celule este de două ori mai mare la animalele convenţionale de laborator decât la cele axenice.

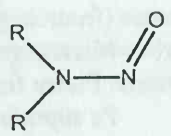
Microbiota normală are funcţia de barieră antiinfecţioasă, care protejează organismele animale de implantarea unor organisme alohtone, ce pătrund împreună cu alimentele sau apa. Funcţia de barieră protectoare antiinfecţioasă este pregnant evidenţiată de comportamentul diferit al animalelor axenice *(germ-free)* faţă de cel al animalelor convenţionale. Şoarecii axenici pot fi infectaţi *per os*, cu mare uşurinţă de *Sh. flexneri* sau cu *S. enteritidis* (10 celule bacteriene). Ele se multiplică, se

stabilizează şi se păstrează la densitatea de 1–10 miliarde celule/g de conţinut intestinal. Animalele holoxenice (convenţionale) elimină microorganismele infectante, cu aceeaşi rată cu care îndepărtează un marker de control inert (sporii de *B. subtilis*, termofili, incapabili să germineze). Doza infectantă este de 10^6 celule de *S. enteridis*. Fenomenul a fost descris sub denumirea de "efect de barieră" (Ducluzeau, 1979), iar ulterior a fost denumit *interferenţă bacteriană*.

Populaţiile de microorganisme din sistemul digestiv şi gazda lor formează un sistem ecologic al cărui echilibru este indispensabil pentru sănătatea individului. În acest sistem se realizează o serie de interacţiuni complexe, sinergice şi antagonice, pe de o parte între diferitele populaţii de microorganisme, iar pe de alta parte, între ele şi gazda lor, care asigură echilibrul sistemului. Administrarea antibioticelor cu spectru larg (neomicină, eritromicină) pentru 1–2 zile, poate să inhibe temporar dezvoltarea microbiotei intestinale, în special a celei aerobe (stările de *disbioză)*. Metronidazolul inhibă componenta anaerobă a microbiotei.

Unele observaţii de laborator demonstrează existenţa unor efecte negative ale microbiotei normale. Unele microorganisme indigene pot favoriza pătrunderea unui microorganism patogen în organismul gazdă. *Entamoeba histolytica* este întotdeauna comensală în intestinul gros, la animalele de laborator. Stabilirea ei în organismele-gazdă depinde de microbiota rezidentă. De aceea, animalele axenice sunt foarte rezistente la infecţie. Rarele episoade de patogenitate la animalele convenţionale sunt determinate, dupa Mackwiak (1982), de intervenţia factorilor de virulenţă proveniţi de la bacteriile intestinale indigene.

Relaţia dintre microbiota normală şi neoplazie a devenit evidentă după ce s-a demonstrat că microorganismele pot hidroliza substanţe inofensive, din care rezultă compuşi cancerigeni. Prin reducerea nitratului şi aminelor (conservanţi ai alimentelor) de către microorganisme pot rezulta *nitrozamine* (Walker, 1973). Unele microorganisme intestinale pot sintetiza nitrozamine *in vivo*, la pH neutru.



Structura generală a nitrozaminelor.

Translocaţia bacteriilor din intestin. Translocaţia este fenomenul de trecere a bacteriilor din lumenul intestinal în ganglionii mezenterici, urmat adesea de localizare în diferitele situsuri extraintestinale. Translocaţia are loc cu precădere la persoanele imunosupresate, expuse unor mari traumatisme sau intervenţii chirurgicale şi determină complicaţii infecţioase grave, adesea sistemice.

Translocaţia se realizează, de obicei, exclusiv cu bacterii aerobe şi facultative aerobe: *E. coli, K. pneumoniae, Proteus mirabilis, Enterococcus sp., Lactobacillus sp., C. albicans* şi probabil *Staphylococcus* sp., dar si cu bacterii patogene*: Salmonella* sp., *L. monocytogenes*.

Prin contrast, în mod normal, bacteriile strict anaerobe nu sunt expuse translocaţiei din intestin şi produc arareori complicaţii infecţioase. Ele pot fi translocate numai în cazurile în care integritatea mucoasei intestinale este grav compromisă (după iradiere letală, arsuri grave, ischemie mezenterică acută, administrare orală de acid ricinoleic etc.).

Bacteriile strict şi facultativ aerobe sunt translocate prin epiteliul intestinal histologic intact. Celulele epiteliului intestinal – în special cele ileale – ar reprezenta poarta principală de intrare, iar ganglionii limfatici mezenterici ar fi cei mai sensibili. Wells (1990) consideră că enterocitele fagocitează bacteriile şi le eliberează la polul bazal, în lamina proprie. De aici pot lua calea limfatică, spre ganglionii limfatici mezenterici, sau ajung la ficat pe cale vasculară.

Bacteriile strict anaerobe nu se pot transloca, deoarece se leagă greu de enterocite, neavând situsuri-receptor pentru celulele epiteliale intestinale. Ele trec numai prin epiteliul lezat. Raportul dintre celulele anaerobe şi cele strict sau facultativ aerobe în intestin oscilează între 100:1 şi 1000:1, ceea ce denotă că translocaţia nu este dependentă de densitate.

3.4. Microbiota normală a tractului urogenital

Tractul urogenital este steril, cu excepţia uretrei şi a vaginului. Microorganismele pot să migreze ascendent prin uretră, până în vezica urinară, dar în mod normal sunt rapid eliminate de anticorpii din secreţii, de acţiunea microbicidă a celulelor epiteliale ce căptuşesc vezica, precum şi de fluxul urinar descendent.

Uretra feminină este colonizată de un număr mare de lactobacili, streptococi şi stafilococi coagulază-negativi. Bacteriile de origine fecală (*E. coli, E. faecalis, P. mirabilis, C. albicans*) pot

coloniza tranzitoriu uretra, dar când ajung în vezica urinară, proliferează şi produc infecţii ale tractului urinar.

Microbiota vaginală este mai abundentă şi mai diversificată. Predomină lactobacilii (bacilii Dőderlein), deoarece se multiplică în mediu acid. Alţi anaerobi vaginali sunt *Bifidobacterium sp., Peptostreptococcus sp., Porphyromonas sp.*, iar bacteriile aerobe sunt reprezentate de *Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Corynebacterium sp., Mycoplasma sp., Candida sp.* În mod obişnuit, *Trichomonas sp.*este prezent în număr mic, dar poate prolifera şi produce vaginita.

3.5. Microbiota normală a pielii

Pielea nu oferă condiţii favorabile dezvoltării microorganismelor, deoarece este expusă unor variaţii extreme de temperatură, umiditate, dezinfectanţi chimici (săpun, şampon). De aceea, populaţia microorganismelor este mult mai mică şi mai simplă comparativ cu alte situsuri ale organismului. Totuşi, numeroase bacterii îşi stabilesc rezidenţa permanentă pe suprafaţa pielii. În plus se produce şi o colonizare tranzitorie cu o diversitate de microrganisme din mediul extern şi cu microorganisme endogene.

Suprafaţa pielii este foarte heterogenă. Există arii uscate şi fără păr (palme, tălpi), arii cu o mare densitate a glandelor sudoripare (regiuni axilare, inguinale, perianală) şi arii bogate în glande sebacee (fruntea, pliurile nazolabiale).

Microorganismele proliferează în mediu umed: zonele cu glande sudoripare şi suprafeţele ocluzate. Pielea feţei, aria perirectală sau perigenitală au o microbiota mai complexă.

Pe suprafaţa pielii, bacteriile anaerobe sunt de 10-100 de ori mai numeroase decât cele aerobe. În raport cu levurile, predomină net bacteriile şi în special, cele Gram pozitive: stafilococi aerobi şi anaerobi (*S. epidermidis, S. viridans* şi alţi stafilococi coagulază-negativi), ocazional *S. aureus, Enterococcus* sp., *Micrococcus sp., Corynebacterium sp., Peptostreptococcus sp., Propionibacterium sp.*

Bacilii coliformi Gram negativi colonizează tranzitoriu suprafaţa pielii, deoarece peretele celular subţire nu protejează celula de acţiunea detergenţilor. *Acinetobacter sp.* se găseşte în zonele umede: regiunea inguinală, axilară, pe tegumentul interdigital. Fungii filamentoşi şi levurile sunt adeseori prezente în pliurile tegumentului, iar micobacteriile acidorezistente nepatogene populează ariile bogate în secreţii sebacee (urechea externă, ariile genitale).

3.6. Microorganismele probiotice

Conceptul de *"probiotic"* a fost formulat în 1965 (Lilly şi Stillwell) pentru a descrie substanţele produse de un protozoar (*Tetrahymena pyriformis*) care favorizează creşterea altui protozoar (*Stylonychia* sp.). Parker (1974), sub denumirea de *probiotic, reuneşte orice supliment alimentar, care are efect favorabil asupra gazdei, prin modificarea microbiotei intestinale.*

Fuller (1989) consideră ca probiotic orice organism viu care adăugat alimentelor are efect benefic asupra organismului gazdă prin ameliorarea echilibrului microorganismelor din sistemul digestiv.

Preparatele probiotice utilizează unul sau mai multe tipuri de bacterii (*Lactobacillus sp., Bifidobacterium* sp.) şi se adaugă în hrana animalelor de crescătorie sub diferite forme (granule, pudră, pastă, capsule).

Un bun probiotic are următoarele caracteristici:

- lipsa de patogenitate şi toxicitate;
- capacitatea de a supravieţui în mediul intestinal;
- să exercite efecte benefice asupra organismului gazdă;
- să fie accesibil din punct de vedere economic;
- să fie stabil prin tehnica de conservare.

Modul de acţiune al probioticelor este relativ puţin cunoscut, dar s-au identificat câteva căi majore:

1) efectul direct, antagonist prin producerea unor metaboliţi de tipul acizilor organici, H_2O_2 sau a unor substanţe macromoleculare cu acţiune antimicrobiană; competiţie pentru nutrienţi; blocarea colonizării bacteriilor patogene prin competiţie pentru situsurile de aderenţă pe suprafaţa epiteliului intestinal;

2) modificarea metabolismului microbiotei intestinale, prin creşterea/diminuarea activităţii unor enzime;
3) stimularea imunităţii prin creşterea activităţii macrofagelor şi a concentraţiei de sIgA.

Efectele produselor probiotice sunt: a) stimularea creşterii în greutate şi protecţia faţă de infecţiile intestinale; b) atenuarea fenomenelor de intoleranţă la lactoză prin deficienţa congenitală a beta-galactozidazei; c) *Lactobacillus* sp. exercită un efect anticancerigen prin inhibarea creşterii celulelor tumorale şi a bacteriilor, care prin activitatea lor enzimatică eliberează substanţe cancerigene din complexe inofensive.

3.7. Gnotobioza şi animalele gnotobiotice

Conceptul de animal axenic (*germ-free*) a fost enunţat de Pasteur încă din 1885. El considera că viaţa animalelor este imposibilă în absenţa microorganismelor. Abordările experimentale ale lui Thierfelder şi Nuttall (1895) au invalidat concepţiile lui Pasteur. Reyniers (1949) a stabilit condiţiile tehnice speciale pentru obţinerea animalelor gnotobiotice.

Terminologia utilizată în studiile de gnotobiologie a fost propusă de Reyniers (1949) şi completată de Luckey (1963) şi Gordon şi Pesti (1971).

Gnotobiotic (gr. *gnotos* = cunoscut) este animalul scos prin intervenţie cezariană sau ecloziune sterilă din ou, crescut şi menţinut continuu în condiţii de izolator, prin tehnici *germ-free*.

Gnotofor – animal purtator al unei (unor) specii cunoscute de microorganisme inoculate în mod deliberat.

Axenic (steril sau *germ-free*) – animal lipsit de orice microorganism viabil.

Monognotofor – animal axenic, inoculat cu o singură specie cunoscută de microorganisme.

Dignotofor – animal axenic inoculat cu doua specii de microorganisme cunoscute.

Gnotobiologie – biologia sistemelor în care sunt prezente numai specii cunoscute.

Convenţional – animal crescut în condiţii obişnuite, în mediu deschis, care conţine *microorganismele asociate* tractului digestiv, pe tegument, etc.

Convenţionalizate – animal axenic, trecut ulterior în condiţii de viaţă liberă.

SPF ("*S*pecific *p*athogen *f*ree")– animale putătoare ale unei microbiote convenţionale normale, în absenţa oricărui microorganism patogen cunoscut.

Mamiferele "sterile" se obţin prin intervenţie chirurgicală cezariană, în spaţiu steril, urmată de histerectomie şi transferul uterului în camera sterilă a unui izolator, în care este eliberat nou-născutul.

Ouăle aflate la sfârşitul perioadei de incubare sunt supuse unei băi dezinfectante, iar ecloziunea are loc într-un dispozitiv sterilizat.

Sistemul izolator de creştere este alcătuit din mai multe compartimente ermetic închise. Fluxul de aer, hrana şi apa sunt sterilizate.

Au fost crescute în condiţii axenice, gândaci şi melci, raţe, găini şi prepeliţe, şoareci, şobolani, cobai, iepuri, oi, câini, porci, bovine, maimuţe şi ponei. Ele au fost păstrate în condiţii de sterilitate microbiologică mai multe generaţii, cu un comportament aparent normal.

3.7.1. Caracteristicile animalelor *germ-free*

Animalele axenice sunt, în esenţă, animale normale, care diferă de cele convenţionale prin absenţa microbiotei asociate.

Din punctul de vedere al ratei de creştere, al capacităţii de reproducere şi al longevităţii sunt comparabile celor convenţionale sau chiar superioare. Fenomenele de îmbătrânire sunt mai lente, sau durata vieţii este chiar prelungită (găini, maimuţe).

Organele care sunt în contact continuu şi intim cu microorganismele sau cu antigene provenite din acestea (ficatul, intestinul, ganglionii limfatici) sunt mai mici decât la animalele convenţionale. În schimb, cecum-ul la rozătoare şi guşa, oasele şi intestinul gros la puii de găină sunt mai mari decât la animalele convenţionale.

Cecum-ul la rozătoare (şoarece, şobolan, cobai) este mult mărit la animalele axenice, iar conţinutul său este de 5 ori mai mare decât la animalele convenţionale. Dimensiunile sale revin la

normal după inocularea animalelor cu *E. coli, Proteus vulgaris, Streptococcus faecalis*, etc. Microbiota ar avea rolul de asigurare al tonusului peretelui intestinal.

Ganglionii limfatici, la animalele axenice sunt subdezvoltați, iar numărul limfocitelor este redus. Concentrația imunoglobulinelor este de numai 15–50% din normal. Sinteza lor este indusă de antigene bacteriene sau de altă natură, prezente în hrana sterilizată, capabile să inducă imunizarea după administrarea orală.

Pleasants a obținut în 1973 animale cu stare imunitară de bază, în absența oricărei stimulări antigenice (*antigen-free*), prin hrănire cu o dietă hidrosolubilă (aminoacizi, glucoză, vitamine, săruri minerale etc.). La organismele *antigen-free* concentrația imunoglobulinelor este nedetectabilă prin tehnicile obișnuite.

3.8. Rolul microbiotei normale

Microbiota rezidentă are de regulă rol benefic atât pentru microorganisme, cât și pentru gazdă, în sensul că fiecare furnizează și respectiv primește ceva esențial.

Microorganismele de pe suprafața corpului și de pe mucoase sunt saprobionte comensale, dezvoltarea lor fiind influențată de temperatură, umezeală, disponibilitatea nutrienților și de factorii inhibitori. Prezența microbiotei rezidente nu este esențială pentru viață, deoarece organismele *germ-free* trăiesc în absența totală a microorganismelor.

Studiile experimentale asupra animalelor axenice au arătat ca microbiota normală, în special intestinală, exercită efecte benefice asupra organismului gazdă:

- stimulează dezvoltarea organelor cu care vine în contact direct;
- sintetizează vitamine (vitamina K, acidul folic, acidul nicotinic, biotina, riboflavina, piridoxina, tiamina și acidul pantotenic), necesare metabolismului gazdei și favorizează absorbția nutrienților;
- stimulează mecanismele de apărare a gazdei;
- împiedică colonizarea tegumentului și a mucoasei cu agenți patogeni prin fenomenul *interferenței* bacteriene. Mecanismul interferenței poate să implice competiția pentru situsurile de legare pe celulele gazdei, competiția pentru nutrienți, inhibiția reciprocă prin produse de metabolism sau prin produse toxice, inhibiția prin substanțe antibiotice sau prin bacteriocine etc. Supresia microbiotei normale favorizează popularea mucoaselor cu microorganisme din mediul extern sau din alte zone corporale, care se comportă ca oportuniste și devin patogene;
- degradează compuși chimici alimentari, care nu pot fi hidrolizați de sucurile digestive;
- favorizează eliminarea fecală a colesterolului.

Microbiota normală este adaptată la modul de viață neinvaziv, dar în anumite condiții, după ce trec în sânge sau în țesuturi, microorganismele rezidente pot deveni patogene. De exemplu, streptococii viridans populează tractul respirator superior, dar dacă pătrund în sânge (după extracția dentară sau tonsilectomie) se localizează pe valvele cardiace și produc endocardita infecțioasă. Speciile de *Bacteroides* sunt cele mai comune bacterii rezidente în colon și sunt inofensive, dar dacă trec în cavitatea peritoneală sau în cea pelviană consecutiv unor procese traumatice sau inflamatorii, produc supurații sau bacteriemii.

Deși microbiota exercită efecte favorabile multiple asupra organismului gazdă, ea nu este esențială și nu este indispensabilă pentru viața acestuia. Datorită evoluției îndelungate s-a creat o stare de dependență a gazdei de anumiți stimuli, în special bacterieni.

Bibliografie

Wexler H. M. 2007. Bacteroides: the Good, the Bad and the Nitty-Gritty. Clin. Micr. Reviews, 20, 4, 593–621.

Xiaojing L., Kolltveit K. M., Tronstad L. Olsen I. 2000. Systemic Diseases Caused by Oral Infection. Clin. Micr. Reviews. 13, 547–558.

Donlan R. M., Costerton J. W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms – Clin. Micr. Reviews, 15, 1, 167–193.

Dune W., Michael Jr. 2002. Bacterial Adhesion: Seen any Good Biofilms Lately? – Clin. Micr. Reviews. 15, 1, 155–166.
Orhage K., Nord C. E. 2000. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. Durgs Exptl. Clin. Res. 2000, XXVI (3):95–111
Todar K. 2009. Online textbook of bacteriology
Blatner A. 2009. Stories in the History of Medicine" lecutre given at the Senior University Georgetown's Winter-Spring 2009 session.
Taubman M. A., Nash D. A. 2006. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. Nature Reviews Immunology 6, 555–563
Curtis J. 2009. Periodontitis (advanced gum disease). Health.com
Pleasants J. R., Reddy Bandaru S., Hessling J. J., Reyniers J. P., Wostmann B. S. 1973. Effect of Germfree Status, Lactation and Fasting Time on Plasma Amino Acids of C3H Mice Annual meetings of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Atlantic City, N.J.
Nuttall G. H. F, Thierfelder H. 1895.Thierisches leben ohne bakterienim verdanungkanol. Z Physiol Chem 21:109–121
Reyniers J. Atrexler P. C., Ervin R. F., Wagner M., Luckey T. D., Gordon H. A. 1949. A Complete Life-Cycle in the "Germ-Free' Bantam Chicken Nature 163, 67–68
Luckey T. D. 1963. Germ free life and gnotobiology. New York: Academic Press.
Lilly D. M., Stillwell R. H. 1965. Probiotics: growth promotic factors produced by microorganisms. Science 147:747–748
Gordon H. A., Pesti L. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host-microbial relationships. Bacteriol Rev. 35:390–429
Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 66:365–378
Parker R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim Nutr Health. 29:4–8.
Ducluzeau, R., Raibaud P. 1979. Écologie microbienne du tube digestif. Masson S.A., Paris.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. PROPRIETĂŢILE MICROORGANISMELOR PATOGENE: PATOGENITATEA ŞI VIRULENŢA BACTERIANĂ

Din multitudinea de microorganisme existente în natură, un număr limitat sunt capabile să se dezvolte în asociaţie cu organismele superioare, iar dintre acestea, un număr restrâns (câteva sute) sunt *patogene*.

Bacteriile patogene au două proprietăţi definitorii: *patogenitatea* şi *virulenţa*. Cei doi termeni au semnificaţie distinctă.

4.1. Definiţii

Patogenitatea (gr. *pathos* – boală, suferinţă; gr.-*geneia*, fr. *génie* – născut, produs al) este proprietatea esenţială a oricărui agent patogen ce constă în capacitatea acestuia de a genera un proces infecţios, acelaşi din punct de vedere clinic, manifestat prin starea de boală, atunci când pătrunde în organismul sensibil pe cale naturală sau pe cale experimentală. Un microorganism patogen este capabil să inducă leziuni tisulare la o gazdă receptivă. În mod obişnuit, patogenitatea este asociată, inexact, cu modul de viaţă parazitară a microorganismelor, dar calitatea de patogen nu se asociază totdeauna cu parazitismul. Majoritatea bacteriilor patogene sunt parazite, iar *in vitro* se dezvoltă ca *saprobionte* pe medii organice, uneori cu compoziţie chimică complexă. Unele bacterii, deşi sunt strict saprobionte, adică se dezvoltă pe materia organică în mediile naturale (de exemplu, *Cl. botulinum*), dar fără a fi parazite, produc totuşi efecte patologice prin intermediul exotoxinelor pe care le secretă.

Patogenitatea a apărut în cursul co-evoluţiei gazdă-parazit şi implică existenţa a patru proprietăţi esenţiale:

- pătrunderea şi localizarea în ţesuturile gazdei;
- multiplicarea şi producerea de toxine/invadarea gazdei;
- inducerea unui răspuns imun şi rezistenţa la mecanismele de apărare ale gazdei;
- producerea leziunilor specifice.

Patogenitatea este un caracter calitativ de specie. De exemplu, *B. anthracis, C. diphteriae, S. typhi, M. tuberculosis* sunt patogene sau *condiţionat patogene*, adică determină apariţia unui proces infecţios numai dacă sunt inoculate în doze foarte mari sau dacă organismul are o rezistenţă generală scăzută. Cel mai ilustrativ exemplu de *patogenitate condiţionată* este oferit de *Ps. aeruginosa*, o bacterie saprobiontă în mediile naturale: organismul uman împiedică, în condiţii obişnuite, colonizarea cu pseudomonade, dar la persoanele imunocompromise, în rănile provocate de arsuri sau de traumatisme sau în ţesutul pulmonar al pacienţilor cu fibroză chistică, *Ps. aeruginosa* produce întotdeauna infecţii.

Alte specii (*Azotobacter sp., Nitrobacter sp., Acetobacter sp.* etc.) nu sunt niciodată patogene, pentru că nu au capacitatea de a stabili interacţiuni cu organismele superioare.

Virulenţa (lb. latină *virulentus* = otrăvitor) este capacitatea relativă a unei tulpini patogene de a determina leziuni tisulare (de a coloniza, de a se multiplica şi eventual de a invada celulele şi ţesuturile gazdei şi/sau de a produce toxine), determinând o stare patologică la o gazdă receptivă.

Virulenţa exprimă *cantitativ* gradul de patogenitate a unei tulpini pentru o anumită gazdă şi este o proprietate *multifactorială*, dependentă de paticularităţile structurale şi fiziologice ale agentului patogen materializate în:

- *infecţiozitate* (sau capacitatea de colonizare);
- *agresivitate* (sau invazivitate);

– *toxigenitate.*

Procesul infecțios

Infecția (lb. latină *inficere* – otravă) este deteminată de capacitatea agentului patogen de a pătrunde, de a se localiza și multiplica în organismele gazdă sensibile. Infecția bacteriană produce modificări de tip alterativ ale organismului gazdă. Ele sunt *primare* (directe), datorate factorilor de patogenitate bacteriană (intoxicații, toxiinfecții, bacteriemii) și *secundare*, mediate de factorii umorali și celulari ai sistemului imunitar (stările de hipersensibilitate).

Factori de virulență

Virulența este corelată cu prezența unor structuri bacteriene (flageli, fimbrii), a unor proteine membranare sau cu unele particularități fiziologice și de sinteză (de exemplu sinteza exotoxinelor sau a exoenzimelor), denumiți *factori de virulență,* care determină producerea unor leziuni în organismul gazdei.

Moleculele care mediază virulența au fost grupate în 4 clase: *adezine, invazine, agresine* și *impedine*. *Adezinele* sunt proteine bacteriene care mediază interacțiunea celulei bacteriene cu o varietate de celule ale gazdei, în special epitelii, ca o primă treaptă de colonizare a gazdei. *Invazinele* sunt proteine bacteriene care permit celulei să intre în celula eucariotă. *Agresinele* sunt molecule, de exemplu toxine și proteaze, care produc leziuni ale gazdei ori favorizează răspândirea infecției. *Impedinele* sunt componente bacteriene care inhibă acțiunea mecanismelor de apărare, fără să producă leziuni.

Moleculele inductoare ale sintezei de citokine sunt, probabil, tot factori de virulență, dar nu aparțin celor 4 clase enumerate mai sus. Componentele care induc sinteza citokinelor, modulează activitatea celulei infectate, cu consecințe patologice și au fost denumite *moduline*.

Analiza genetică a factorilor de virulență bacteriană a arătat că bacteriile patogene se disting de bacteriile nepatogene, prin prezența genelor specifice de patogenitate, adeseori organizate în așa numitele "insule de patogenitate" – aglomerări de gene care aparent au fost dobândite în evoluție, pe calea transferului orizontal al genelor (fig. 30, 31).

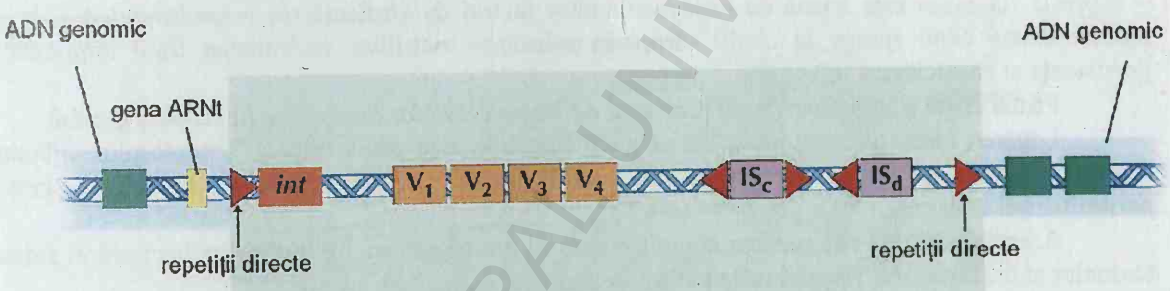


Fig. 30. Structura unei insule de patogenitate (V1-4, gene de virulență), IS (secvențe de inserție) (Barton et al., 2009)

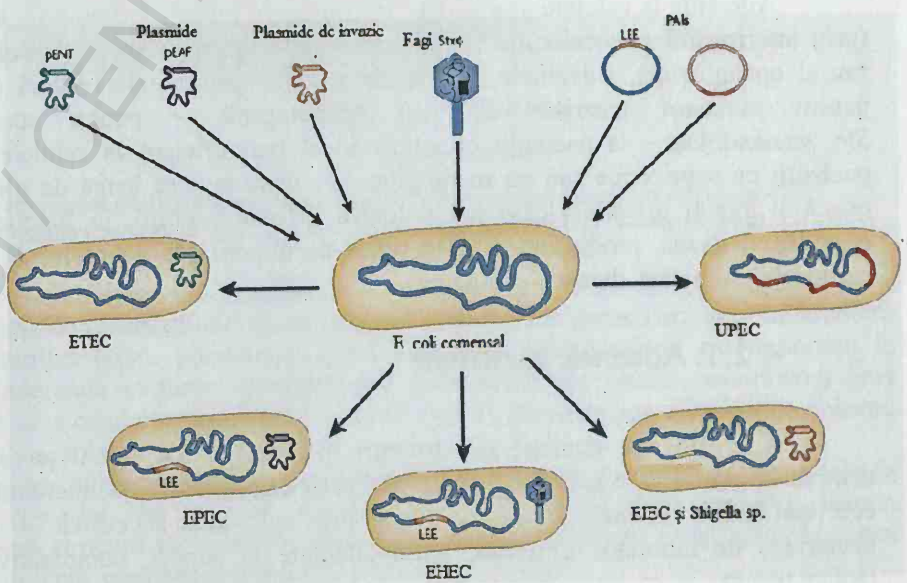


Fig. 31. Reprezentarea evoluției bacteriilor patogene din bacterii comensale prin dobândirea genelor de virulență prin transfer orizontal mediat de diferite elemente genice mobile. PAIs (insule de patogenitate – *pathogenicity islands*) (după Ahmed et al., 2008).

Bacteriile patogene conţin 1–2 insule de patogenitate, dar diferite tulpini de *Salmonella* au până la 5 astfel de secvenţe "insulare" de ADN. Originea comună a genelor codificatoare a factorilor de virulenţă explică faptul că agenţi patogeni cu grad mic de înrudire poartă gene de virulenţă strâns înrudite. Afirmaţia este foarte evidentă pentru un set de aproximativ 20 de gene, codificatoare ale unui set de proteine care definesc un mecanism de patogenitate, denumit *sistem de secreţie de tip III*.

Scopul practic al cercetării proprietăţilor de virulenţă a unui agent patogen este obţinerea unor mijloace de contracarare a exprimării sau acţiunii factorilor de virulenţă (vaccinuri) pentru a preveni infecţia.

4.2. Infecţiozitatea

Infecţiozitatea reprezintă capacitatea unui microorganism de a depăşi mijloacele de apărare ale organismului, de a se implanta şi de a coloniza ţesuturile sănătoase, adică de a stabili o localizare şi de a forma un *focar primar de infecţie*. Colonizarea ţesutului de către un microorganism patogen este o fază iniţială critică pentru evoluţia procesului patologic şi este un fenomen complex, care implică atât implantarea, cât şi utilizarea substanţelor nutritive disponibile în mediul gazdei.

Traversarea stratului de mucus de către agenţii infecţioşi este favorizată de prezenţa organitelor de mişcare (flageli), dar şi prin secreţia substanţelor mucolitice (de exemplu, mucinaza produsă de *Helicobacter pylori* şi *Vibrio cholerae*), stimularea secreţiei de mucus, producerea unor toxine care inhibă motilitatea ciliară.

În medii apoase motilitatea este asigurată de flageli dispuşi peritrih, în timp ce flagelii cu localizare polară favorizează traversarea rapidă a mediilor cu vâscozitate crescută, iar fenomenul de hiperflagelare asigură deplasarea pe suprafaţa majorităţii mucoaselor (de exemplu, la *Proteus mirabilis* – expresia flagelilor este legată de exprimarea altor factori de virulenţă; *B. bronchiseptica* – devine mobilă atunci când ajunge în medii sărace în substanţe mutritive, mobilitatea fiind implicată în persistenţa şi cronicizarea infecţiei).

Prima etapă a colonizării unui ţesut este *aderenţa celulelor bacteriene la celulele gazdei.*

Legarea bacteriilor patogene de celulele sensibile este etapa iniţială a procesului infecţios. Aderenţa împiedică îndepărtarea bacteriilor prin: fluxul secreţiilor, tuse, motilitatea cililor, peristaltismul intestinal.

Aderenţa asigură colonizarea anumitor situsuri din organism, multiplicarea bacteriilor, sinteza toxinelor şi desfăşurarea reacţiei inflamatorii de apărare.

Bacteriile aderă în special la *epiteliile mucoaselor*, dar şi la *epiteliile cheratinizate*, la *endotelii*, la *ţesutul osos*, la *smalţul dentar* etc.

Aderenţa la celulele gazdei este *directă* (prin intermediul adezinelor specifice) sau *indirectă* (prin intermediul glicocalixului sau al moleculelor de matrice extracelulară de tipul fibronectinei sau al opsoninelor). Adezinele bacteriene conferă specificitate tisulară (de exemplu, *H. pylori* – pentru mucoasa gastrică; *E. coli* uropatogenă – pentru mucoasa tractului urinar; *Str. pneumoniae* – la pacienţii cu otite, aderă mai eficient la celulele nazofaringelui, decât la pacienţii cu septicemie sau cu meningite; *Str. mutans* – se leagă de glicoproteine salivare), deşi există şi agenţi infecţioşi care pot coloniza diferite ţesuturi, în funcţie de poarta de intrare în organismul gazdă, producând diferite tipuri de infecţii (de exemplu, *B. anthracis* poate produce cărbunele pulmonar, digestiv şi cutanat).

4.2.1. Adezinele bacteriene

Aderenţa este mediată de structuri specializate ale suprafeţei bacteriene, cunoscute sub denumirea generică de *adezine*. Structurile bacteriene de aderenţă, anatomice sau moleculare sunt de cele mai multe ori *adaptative*. Ele dispar prin cultivarea succesivă *in vitro*. De aceea, tulpinile bacteriene de laborator sunt mai puţin aderente la suport, comparativ cu tulpinile bacteriene izolate recent.

Aderența este condiționată de *complementaritatea sarcinilor electrice* ale celor două suprafețe. Cele mai multe bacterii au o *sarcină netă negativă* a suprafeței lor, dar au și zone limitate electropozitive, precum și molecule cu caracter hidrofob.

Aderența reprezintă un avantaj ecologic major pentru bacteriile patogene, cu privire la asigurarea nutrienților, protecția față de anticorpi și lizozim etc. Multiplicarea lor, după aderență, are loc cu o rată net superioară față de a celulelor neaderente.

Mecanismele aderenței bacteriene *in vivo* au fost studiate în special pentru bacteriile generatoare de carii dentare. Aderența celulelor bacteriene patogene la celulele sensibile implică participarea a doi factori: o adezină localizată pe suprafața bacteriei și un receptor de pe suprafața celulei gazdă (fig. 32).

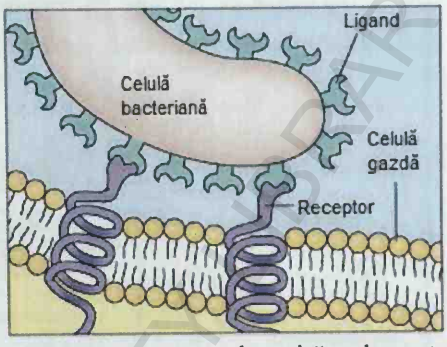


Fig. 32. Reprezentarea schematică a adererenței celulelor bacteriene la celula gazdă sensibilă, mediată de adezine (liganzi) și receptori specifici (http://lib.bioinfo.pl/courses/view/312, http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Images/15-01_adherence_1.jpg).

Adezinele bacteriene se împart în două categorii: a) *adezine de natură proteică; b) adezine neproteice.*

Grupul adezinelor proteice cuprinde *fimbriile*, care sunt structuri filamentoase, neflagelare ale suprafeței celulare, diferite de pilii participanți la conjugare. Fimbriile fac parte din categoria lectinelor și se găsesc numai la bacteriile Gram negative. Ele se leagă de receptori specifici ai membranei celulare. Fimbriile care aparțin aceluiași tip sunt formate din molecule proteice identice. Diferitele variante fimbriale se deosebesc prin lungimea filamentului și prin greutatea moleculară a monomerilor polipeptidici constitutivi.

În aceeași categorie sunt incluse o categorie de *proteine* din structura membranei externe a bacteriilor Gram negative sau din structura peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive, care îndeplinesc funcția de adezine (fig. 33).

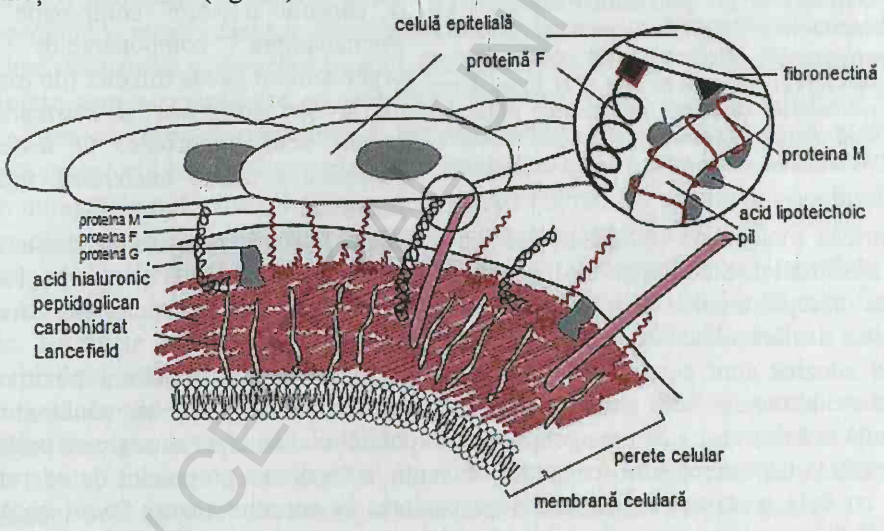


Fig. 33. Diversitatea structurilor implicate în aderența bacteriilor Gram pozitive (*Streptococcus pyogenes)* la celula gazdă sensibilă (http://d3jonline.tripod.com/10-Bacteria/Microbial_Virulence.htm).

Grupul adezinelor neproteice.

O serie de substanțe de natură glucidică, cu structuri complexe și particulare intră în structura peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive și Gram negative, exercitând un rol important în patogeneza bacteriană (aderență, evitarea mecanismelor de apărare ale gazdei, menținerea unei anumite încărcături electrice a celulelor bacteriene). Studiul acestor glicoconjugate constituie obiectul glicomicii bacteriene (Reid și colab., 2010) (fig. 34).

Cele mai comune adezine neproteice sunt *polizaharidele* care intră în structura unei rețele de tip *glicocalix*, de tip *capsular* sau a unei structuri neorganizate de tipul *stratului mucos*. Exopolizaharidele formează structuri capsulare la multe bacterii patogene și au consistență de geluri hidratate. Ca factori de virulență, exopolizaharidele au două roluri majore:

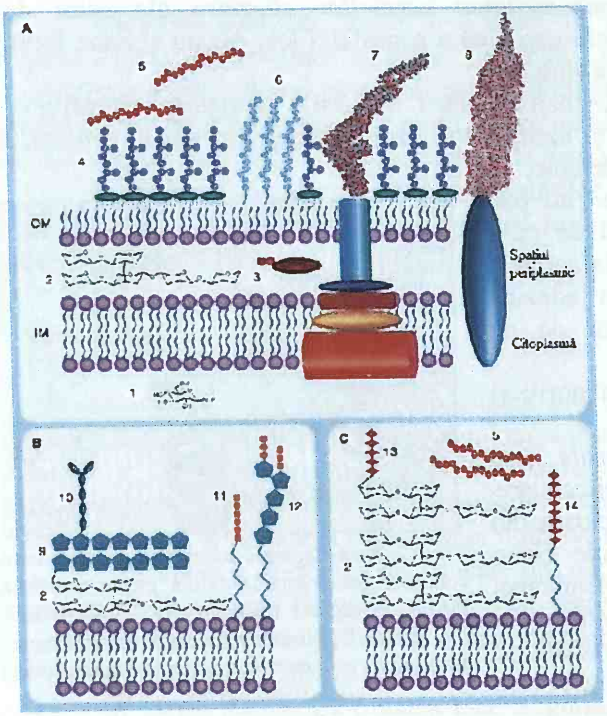


Fig. 34. Diversitatea glicomului bacterian: **(A)** Bacterii Gram negative **(1)** precursori glucidici complexați cu nucleotide; **(2)** peptidoglican; **(3)** Glicoproteine *N-linkate*; **(4)** LPS/LOS; **(5)** polizaharide extracelulare; **(6)** polizaharide capsulare; **(7)** proteine glicozilate *O-linkate – Salmonella enterica*; **(8)** pilină – *Neisseria gonorhoeae* **(B)** Micobacterii **(9)** arabinogalactan **(10)** acizi micolici **(11)** lipomannan and **(12)** lipoarabinomannan. **(C)** polizaharide capsulare, polizaharide extracelulare, PG **(13)** acid teichoic **(14)** acid lipoteichoic, IM: membrana internă; OM: membrana externă (după Reid și colab., 2010).

a) *aderența la substratul tisular*. După Gristina și colab. (1985), atât suprafața celulei bacteriene, cât și a substratului tisular sunt *polianionice*. Sarcinile electrice asemănătoare determină respingerea celulei bacteriene de către substratul tisular. Forțele de respingere sunt contracarate de forțele de atracție London-van der Waals. Ele permit realizarea unor interacțiuni hidrofobe între moleculele suprafeței bacteriene și ale celulei gazdă. Exopolizaharidele bacteriene intensifică interacțiunile dintre liganzii bacterieni și tisulari. Astfel, țesutul este acoperit de un biofilm, în care agregatul de celule bacteriene, înconjurat de o matrice moleculară, aderă strâns la substrat;

b) *protecția celulei bacteriene* față de sistemele de apărare ale gazdei. Capsula împiedică fagocitoza pentru că bacteriile capsulate formează microcolonii și înglobarea lor de către fagocite devine dificilă. Cu cât suprafața celulei bacteriene este mai hidrofilă, cu atât este mai greu fagocitată. Pe de altă parte, complementul și anticorpii nu au acces la suprafața celulei. Unele specii bacteriene produc o capsulă a cărei compoziție chimică este asemănătoare componentelor tisulare ale organismului gazdă infectat (de exemplu, capsula de la *Str. pyogenes* și *Pasteurella multocida* conțin acid hialuronic. O astfel de capsulă camuflează celula bacteriană față de sistemul imunitar).

Matricea moleculară polizaharidică, cu structură fibroasă favorizează creșterea celulelor și stabilitatea biofilmului. Stabilitatea biofilmului asigură formarea continuă de microcolonii, persistența și extinderea infecției cronice. Din structura sa "scapă" periodic celule bacteriene care trec în sânge sau în lichidele tisulare adiacente, favorizând extinderea infecției.

Alte adezine sunt acizii lipoteichoici, caracteristici bacteriilor Gram pozitive, ancorați de glicolipidele membranare. Sunt structuri moleculare filamentoase, foarte asemănătoare fimbriilor, cu rol de aderență la substrat. La *Str. pyogenes*, acizii lipoteichoici au efect sinergic cu proteina M.

Adezinele neproteice sunt mai puțin eficiente în medierea proceselor de aderență bacteriană, comparativ cu cele proteice. Polizaharidele capsulare, în anumite cazuri favorizează aderența, iar alteori au efect invers (de exemplu, polizaharidele împiedică aderența celulelor de *H. influenzae, N. meningitidis* sau *P. multocida* tip A).

Receptori de adezine. Interacțiunea dintre celula epitelială sensibilă și adezinele bacteriene este mediată de *receptorii de adezine* și se bazează pe principiul complementarității spațiale.

Uneori, interacțiunea este *nespecifică*, ceea ce explică faptul că unele specii bacteriene (*Salmonella* sp., *Yersinia* sp.) infectează atât celulele intestinale umane, cât și liniile celulare de *Drosophila.* sp. Alteori, interacțiunea are un grad înalt de *specificitate*. De exemplu, *Str. pyogenes* se localizează la nivelul epiteliului faringian și foarte rar în tractul urinar, iar *E. coli* colonizează epiteliul intestinal și al căilor urinare, dar foarte rar pe cel respirator.

Helicobacter pylori, un patogen specific uman, aderă la celulele epiteliale ale mucoasei gastrice, dar nu la celulele profunde ale mucoasei sau ale colonului. Pe celulele epiteliului, *H. pylori* recunoaște antigenul de grup sanguin Lewis, dar probabil și alte molecule, deoarece *H. pylori* infectează și indivizi negativi pentru acest antigen. Un factor esențial pentru colonizare este *ureaza*, pe

BUCHAREST ALUMNI UNIVERSITY LIBRARY

care *H. pylori* o produce în cantități foarte mari. *In vitro*, celulele de *H. pylori* hidrolizează ureea, eliberând amoniul care neutralizează aciditatea și permite colonizarea inițială. Amoniul generat prin hidroliza ureii produce NH_4OH care se disociază și ionul OH^- produce leziuni ale mucoasei.

Receptorii de adezine ai celulelor epiteliale sunt molecule din familia *integrinelor*, care îndeplinesc funcții fiziologice importante: leagă proteine plasmatice, dar și proteine din matricea extracelulară (fibronectine, fibrinogen, laminina, colagenul de tip I etc.).

Receptorii de adezine sunt molecule ale *suprafeței celulei* sau se găsesc la nivelul *mucopolizaharidelor* care tapetează întotdeauna epiteliile mucoase.

Din punct de vedere chimic, receptorii de adezine sunt glicoconjugate: *glicoproteine* ale membranei celulare sau ale stratului mucopolizaharidic și *glicolipide* din structura membranei (fig. 35).

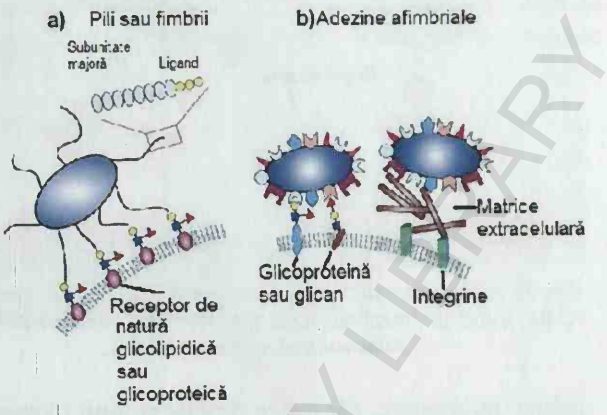


Fig. 35. Reprezentarea schematică a aderenței bacteriene la celula gazdă, mediată de adezine fimbriale sau afimbriale, prin intermediul receptorilor de natură glicolipidică sau glicopeptidică (după Nizet și Esko, 2009).

Glicoproteinele și glicolipidele proemină la suprafața membranei celulare și expun la exterior catene oligozaharidice mai mult sau mai puțin complexe, cu rol de receptori de adezine.

Glicoproteinele din stratul mucopolizaharidic sunt formate din catene polipeptidice legate prin punți S-S. Catena oligozaharidică este formată din N-acetil-galactozamină, N-acetil-glucozamină, fucoză, galactoză și acid sialic. Glicoproteinele din mucus se găsesc și în secreții (salivară, digestive).

Glicoproteinele membranare se deosebesc de cele din mucus: N-acetil-galactozamina lipsește, locul ei fiind luat de manoza și de acizii uronici. Catenele glicoproteice ale mucopolizaharidelor și ale suprafeței celulare sunt asemănătoare cu cele de pe suprafața eritrocitelor și formează antigenele de grup sanguin. Așa se explică proprietățile hemaglutinante pe care le posedă anumite adezine bacteriene, dacă receptorul lor celular se găsește pe hematii.

Glicoconjugatele pot avea rol de receptori pentru toxine. De exemplu, glicolipidul GM_1, prin componenta sa oligozaharidică este receptor specific al toxinei holerice.

Detectarea localizării receptorilor glicoproteici și glicolipidici pe suprafața celulei este posibilă prin utilizarea lectinelor. Lectinele sunt glicoproteine ce se leagă specific cu un rest oligozaharidic. Lectinele cuplate cu un derivat fluorescent sunt utilizate pentru a studia repartiția receptorilor suprafeței celulare.

Modularea expresiei proprietăților de aderență se poate face, teoretic, pe mai multe căi:

- prin blocarea receptorilor celulari cu *analogi structurali ai adezinei bacteriene*. De exemplu, aderența streptococilor poate fi inhibată *in vitro*, dacă la mediul de reacție se adaugă acid lipoteichoic, analogul structural al adezinelor acestor bacterii;
- prin utilizarea *analogilor structurali ai receptorilor celulari*. D-manoza, adăugată în mediul de reacție inhibă aderența *S. typhimurium* și *Sh. flexneri* la eritrocitele de cobai. Bacteriile poartă fimbrii de tip I, ai căror receptori celulari sunt glicoproteine cu manoză (fig. 36);
- blocarea parțială sau totală a adezinei cu *anticorpi specifici* este considerată ca o modalitate eficientă de protecție. Astfel, starea imunitară postvaccinală sau consecutivă unei infecții, asigură o protecție bună față de o infecție ulterioară cu același agent sau cu alți agenți care au adezine comune;
- utilizarea *antibioticelor la doze subinhibitorii* este o modalitate de a modifica expresia adezinelor. Dozele subinhibitorii blochează, parțial sau total, biosinteza unor constituenți ai suprafeței celulare, antrenând și modificări ale anumitor proprietăți, inclusiv a celor de aderență.

BCU "IOAN CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

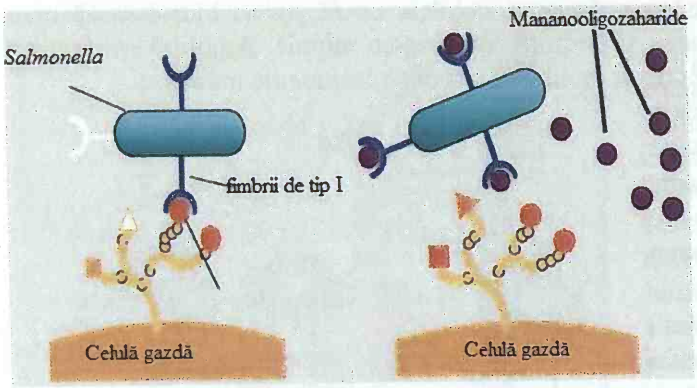


Fig. 36. Evidențierea efectului anti-infecțios al manano-oligozaharidelor (MOS), analogi structurali ai receptorilor pentru fimbriile de tip I la *Salmonella* (după Moran, 2009).

Receptorii celulari de adezine se modifică, atât cantitativ, cât și calitativ.

Modificările receptorilor celulei gazdă pot favoriza aderența și invazia tisulară. Un exemplu este infecția severă produsă de *Str. pneumoniae*, care determină infecții clinice (pneumonie, otită medie, septicemie).

Sensibilitatea la infecție crește foarte mult consecutiv unei infecții virale a tractului respirator. Citokinele gazdei activează receptorul pentru PAF (*platelet activating factor*), pe suprafața celulelor epiteliului pulmonar.

Pneumococii ambelor tipuri de colonii (transparente și opace) aderă la suprafața celulei pulmonare, dar cei ce produc colonii transparente invadează circulația sistemică prin capilarele pulmonare ori prin vasele limfatice.

Astfel se explică predispoziția pacienților infectați cu un virus al tractului respirator la complicațiile consecutive pneumoniei cu *Str. pneumoniae* (meningită, septicemie).

Interacțiunea unui patogen cu celula gazdă nu este mediată întotdeauna de receptori celulari. Adeseori, bacteriile patogene activează căile de semnalizare ale celulei, direct prin componentele celulare sau prin intermediul citokinelor inflamatorii.

4.2.2. Biofilmele microbiene

Aderența la un substrat reprezintă o etapă inițială a formării biofilmului microbian.

Biofilmul este o *comunitate microbiană sesilă alcătuită din celule atașate ireversibil la un substrat, la o interfață sau între ele, încorporate într-o matrice de substanțe polimerice extracelulare pe care le-au produs și manifestă un fenotip modificat cu privire la rata de creștere și de transcriere a genelor* (Donland și Costerton, 2002).

Etapele formării unui biofilm. Pentru a forma biofilmul, bacteriile trebuie să adere la un substrat. Condiția inițială este deplasarea microorganismelor din mediu la suprafața substratului, care se poate realiza prin trei mecanisme:

- *prin difuziune* – consecința mișcării browniene a celulelor bacteriene – asigură deplasarea lentă într-un mediu staționar, ca și în cursul procesului de sedimentare, în care poate reprezenta singurul mod de contact al microorganismelor cu diferite substraturi;
- *prin curenți de convecție,* asociată cu circulația lichidului în care sunt suspendate, poate asigura un transport cu câteva ordine de mărime mai rapid decât cel precedent;
- *mișcarea activă,* cea mai rapidă, poate duce la contacte întâmplătoare sau orientate chimiotactic în cazul existenței unui gradient chimic în regiunea interfacială.

În condiții naturale, orice suprafață inițial „curată", este acoperită în scurt timp de molecule adsorbite, în general, de natură proteică. Încă din faza în care se găsesc la oarecare distanță de substrat, microorganismele sunt expuse forțelor generale fizico-chimice. Aderența la substrat este inițial reversibilă, în sensul unei depuneri pe suprafața suport, cu menținerea în continuare a mișcării browniene și flagelare și cu posibilitatea de îndepărtare prin agitare ușoară sau chiar prin propria mobilitate. Un rol important în procesul de aderență au atât interacțiunile London-van der Waals, care sunt de regulă atractive, tensiunea superficială*, legăturile covalente, cât și forțele electrostatice de respingere. În mediile naturale, datorită structurilor învelișului celular, atât bacteriile Gram negative, cât și cele Gram pozitive sunt încărcate electronegativ. Energia potențială rezultată din interacțiunea lor este variabilă și în funcție de concentrația electroliților determină comportarea bacteriilor în raport cu substratul.

*Tensiunea superficială se manifestă la nivelul suprafeței de separare dintre un lichid și un gaz (sau dintre două lichide nemiscibile). Suprafața lichidului se comportă ca o membrană elastică, ce tinde să se contracte și să se micșoreze la minimum posibil. Tensiunea superficială este o forță rezultantă a atracțiilor din interior și exterior, exercitate asupra moleculelor din stratul de separare lichid-gaz sau lichid-lichid.

Etapa de legare ireversibilă sau permanentă este caracterizată prin încetarea mişcării browniene şi prin posibilitatea îndepărtării bacteriilor aderente numai sub acţiunea unor forţe puternice de agitare. Aderenţa este favorizată de prezenţa polizaharidelor extracelulare şi a glicoproteinelor preformate sau sintetizate *de novo* pe suprafaţa celulei care aderă. Fenomenul explică tendinţa superioară de aderenţă la substrat, a bacteriilor în faza exponenţială de creştere, comparativ cu cele aflate în faza staţionară, îmbătrânite sau moarte (fig. 37).

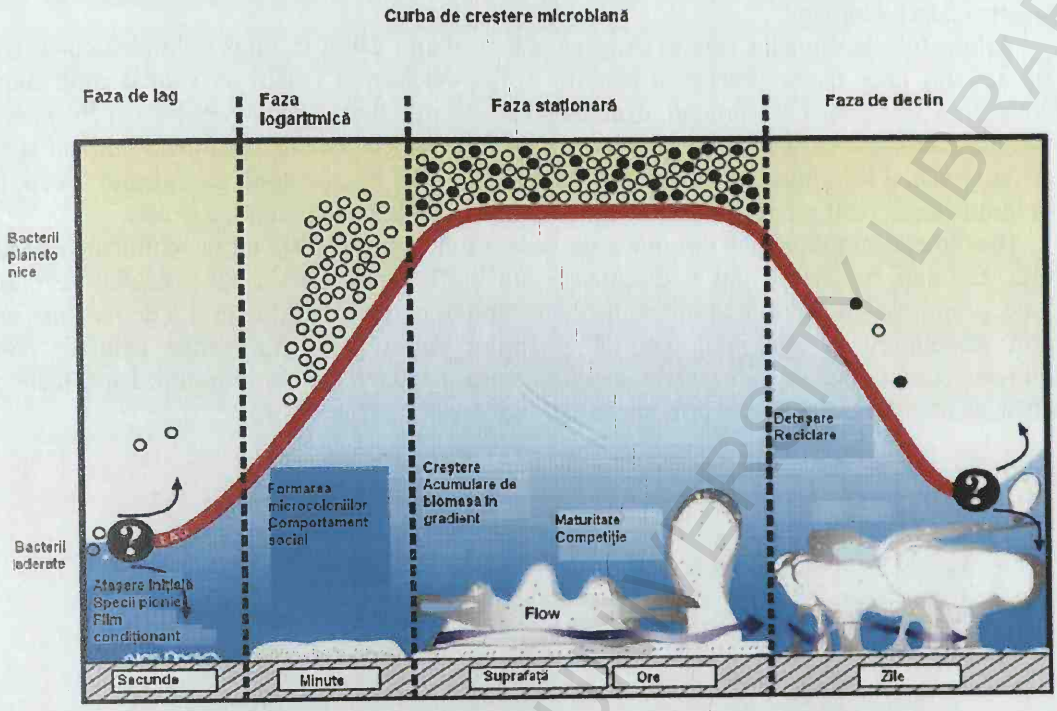


Fig. 37. Prezentarea corelaţiilor dintre densitatea bacteriană, faza de creştere a unei culturi asincrone, în sistem discontinuu, şi etapele formării biofilmului microbian (după Costerton şi colab., 1999).

După legarea fermă, bacteriile încep să crească şi să se multiplice rapid. Celulele legate ireversibil de substrat, dar nu şi între ele, formează un *strat continuu monocelular* care acoperă toată suprafaţa expusă a substratului. Celulele legate atât de substrat, cât şi între ele formează *microcolonii* şi *biofilme*. Ulterior, biofilmele rezultate din creşterea pluristratificată a bacteriilor pot fi colonizate şi de alte specii incapabile, *per se,* să colonizeze suprafeţe străine, care pot contribui la organizarea mai complexă a biofilmului. Se adaugă, uneori, cantităţi importante de polimeri specifici cu structură reticulată sau fibrilară, care ancorează suplimentar celulele de substrat şi unele de altele (fig. 38).

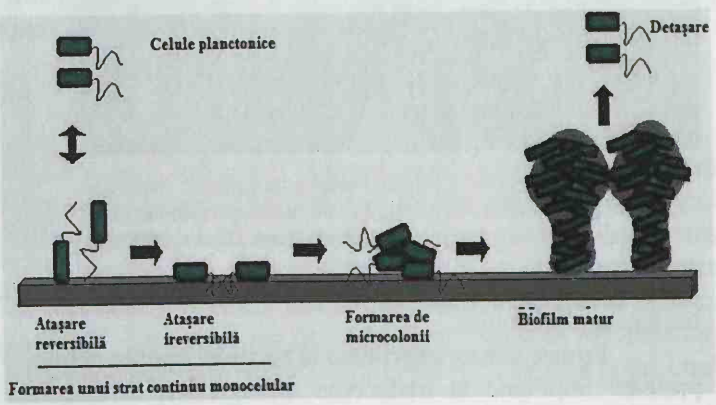


Fig. 38. Diagramă prezentând etapele dezvoltării unui biofilm de *Ps. aeruginosa* 1. Ataşarea iniţială, reversibilă, a celulelor la substrat. 2. Sinteza exopolizaharidelor care determină ataşarea ireversibilă. 3. Formarea microcoloniilor. 4. Maturarea arhitecturii biofilmului. 5. Dispersia celulelor din biofilm (După Caiazza şi colab., 2007, http://www.dartmouth.edu/~gotoole/swarm.html).

Când biofilmul devine suficient de gros, straturile profunde devin anoxice şi conţin predominant specii anaerobe. Mai devreme sau mai târziu, cel puţin celulele de la baza sistemului

devin înfometate şi mor. Anoxia, moartea multor celule şi producerea de gaze pot destabiliza biofilmul, determinând detaşarea şi desprinderea lui de suprafeţele solide. Creşterea poate fi reluată având un caracter ciclic (Zarnea, 1994).

Proprietăţile biofilmelor

Biofilmele bacteriene sunt foarte heterogene în ceea ce priveşte structura, fiziologia, ecologia şi parametrii fizico-chimici.

Arhitectura biofilmelor este heterogenă atât în spaţiu cât şi în timp, schimbându-se constant datorită acţiunii unor factori interni şi externi. Tolker-Nielsen şi colab. au studiat rolul motilităţii celulare asupra arhitecturii biofilmului, examinând interacţiile dintre *Ps. aeruginosa* şi *Ps. putida* prin microscopie confocală de baleiaj cu raze laser. Cocultivarea celor două organisme într-un sistem de creştere continuă, a avut iniţial ca rezultat formarea unor mici microcolonii ale fiecărei specii, însă în timp coloniile au devenit mixte, datorită migrării celulelor de la o microcolonie la alta.

Biofilmele sunt dinamice din punct de vedere funcţional şi răspund la schimbarea condiţiilor mediului. Celulele bacteriene pot fi diseminate din biofilm prin *eliberarea celulelor* rezultate din diviziune, prin *dispersie* datorită gradientului concentraţiei nutrienţilor, procesului de *quorum sensing*, sau prin *diseminare în agregate*, datorită curenţilor de curgere. Agregatele celulare păstrează sensibilitatea scăzută faţă de substanţele antimicrobiene, caracteristică biofilmului. Biofilmele pot de asemenea, să migreze pe suprafeţe prin modalităţi foarte variate (fig. 39, 40).

Fig. 39. Modalităţi de desprindere a celulelor din biofilm (după Costerton şi colab., 1999)

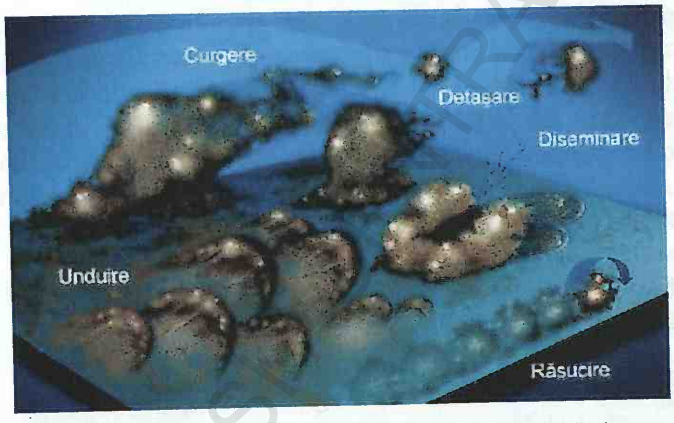


Fig. 40. Modalităţi posibile de deplasare a biofilmelor: deplasare colectivă prin unduire sau rostogolire pe suprafaţă; prin detaşare; deplasare individuală prin diseminare (după Dircks, 2003).

Expresia genică este diferită la bacteriile incluse în biofilm faţă de cele planctonice. Brőzel şi colab. (1995, citaţi de Stoodley, 2002) au evaluat schimbările expresiei genice la celulele ataşate de *Ps. aeruginosa* şi au arătat că în timpul diferitelor etape ale aderenţei, nivelul de expresie a peste 70 de gene s-a modificat.

Sauer şi colab. (2002) au arătat că biofilmele mature de *Ps. aeruginosa* prezintă un profil proteic radical diferit de acela al bacteriilor planctonice crescute în chemostat. Aproximativ 50% din proteomul detectat (peste 800 de proteine) prezintă diferenţe de expresie de şase ori mai mari sau chiar mai mult. Dintre acestea, peste 300 de proteine au fost detectate în eşantioanele de biofilm matur, dar nu la bacteriile planctonice.

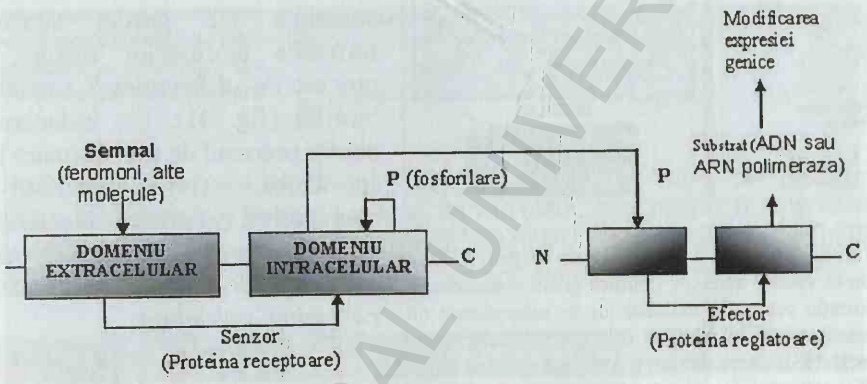
Printre genele exprimate la un nivel înalt în celulele biofilmelor mature sunt cele care codifică proteine implicate în traducerea mesagerilor, în metabolism, în transportul membranar şi/sau în secreţie şi reglarea genică.

Celulele biofilmului îşi coordonează comportamentul prin molecule de semnalizare destinate „comunicării" intercelulare. Comunicarea intercelulară este un aspect esenţial al convieţuirii într-o

comunitate bacteriană şi este mediată prin *semnale chimice* denumite şi „feromoni bacterieni" sau autoinductori. Există dovezi că unele semnale chimice, produse de către celule şi eliminate în mediul extern, pot fi interpretate nu doar de membrii aceleiaşi specii, ci şi de alte specii microbiene şi poate chiar de organisme mai complexe (comunicare inter-regn).

În populaţiile planctonice, semnalele chimice produse de celule nu sunt suficient de concentrate pentru a determina schimbări în expresia genică. Totuşi, în biofilme, matricea care susţine celulele în strânsă proximitate permite acumularea moleculelor de semnalizare în concentraţii suficiente pentru a determina schimbări coordonate în comportamentul celular. Populaţiile bacteriene îşi activează unele gene numai atunci când recepţionează stimulii chimici care semnalează că populaţia lor este destul de numeroasă pentru a fi avantajos şi/sau "sigur" să iniţieze schimbarea unei activităţi genice. De exemplu, unele bacterii patogene nu vor produce toxine până la atingerea unei densităţi adecvate pentru a supravieţui mecanismelor de apărare a gazdei. Modalitatea de recunoaştere a densităţii celulare a unei populaţii prin mecanisme de semnalizare chimică intercelulară a fost denumit *quorum sensing and response* (QS).

QS este un sistem de reglare ubiquitar în lumea bacteriilor, care prezintă două componente implicate în transducţia semnalului: o componentă proteică receptoare (senzor), cu un domeniu extracelular care „recepţionează" semnalele extracelulare şi un domeniu intracelular cu acţiune enzimatică de histidin-kinază, localizată membranar; o componentă proteică reglatoare (efector), localizată în citoplasmă, cu rol activator sau represor al transcrierii genice, prin modificarea conformaţiei specifice a ADN sau prin interacţiune cu ARN- polimeraza.



Fiecare celulă dintr-o populaţie bacteriană produce o anumită cantitate de feromon (autoinductor) care se acumulează pe măsura creşterii densităţii celulare. La atingerea stării de *quorum* bacterian, feromonii (denumiţi în acest caz factori de *quorum*) vor atinge concentraţia prag necesară pentru a interacţiona cu proteine receptoare (senzor). Sub influenţa feromonilor, proteina-senzor se activează printr-un proces de autofosforilare. Proteina efectoare activată prin fosforilarea domeniului aminoterminal va interacţiona direct cu ADN bacterian, modulând activitatea anumitor gene.

Cel mai studiat sistem de comunicare interbacteriană, prin intermediul feromonilor, este sistemul homoserin-lactonelor (HL) şi al derivaţilor lor, funcţional la bacteriile Gram negative.

Sistemele QS, la bacteriile Gram- pozitive, implică semnale chimice diferite de HL. Unele specii de *Streptomyces* sintetizează compuşi difuzibili similari autoinductorilor, denumiţi generic, *butanolide*, care intervin în reglarea producerii antibioticelor şi a metaboliţilor generaţi în faza staţionară. Cel puţin două peptide secretate de *B. subtilis* sunt necesare pentru inducerea stării de competenţă şi sporulare. La *S. aureus* un singur octapeptid este suficient pentru declanşarea expresiei coordonate a mai multor factori de virulenţă. Feromonii oligopeptidici sunt necesari şi pentru transferul conjugativ la *Enterococcus faecalis*. Sporularea la *Myxococcus xanthus* necesită, de asemenea, integrarea unor semnale extracelulare, dintre care cel puţin unul este constituit din aminoacizi.

Primul sistem QS a fost evidenţiat la bacteriile luminiscente (*Vibrio fischeri, Vibrio harveyi, Photobacterium* sp.) care trăiesc în simbioză în organele luminoase ale unor specii de peşti marini de

mare adâncime şi ale diferitelor specii de moluşte. Aceste bacterii produc lumină (prin activarea genelor ce codifică luciferaza) numai în stare simbiotică. În stare liberă, când densitatea bacteriană este scăzută, bacteriile nu produc luciferază. Aceleaşi bacterii, cultivate în condiţii de laborator, la atingerea unei densităţi critice, îşi activează genele pentru luciferază, consecinţa fiind creşterea bruscă de circa 100 de ori a cantităţii de lumină eliberate de fiecare celulă. Prin adăugarea la o cultură bacteriană cu densitate mică a unui supernatant de cultură bacteriană cu densitate mare, celulele şi-au activat genele pentru luciferază, demonstrându-se astfel reglarea acestui proces fiziologic prin intermediul unui factor solubil (feromon) ce se acumulează în mediul de cultură pe măsura creşterii densităţii culturii bacteriene. Aceste observaţii explică de ce bacteriile luminescente nu pot produce lumină atunci când trăiesc în stare liberă şi la densităţi scăzute în mediul marin. În schimb, în condiţiile simbiozei cu organele luminoase ale organismelor superioare, aceleaşi specii bacteriene supuse unor condiţii favorabile de creştere şi în acelaşi timp, unei restricţii spaţiale, pot atinge densităţi celulare mult mai mari, necesare inducţiei feromonilor bacterieni.

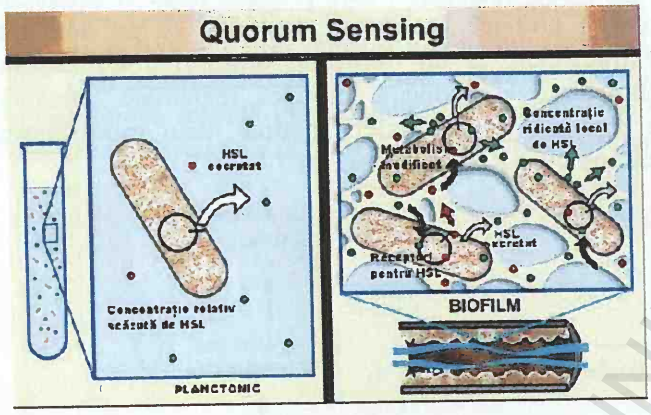


Fig. 41. Ilustrarea rolului mecanismului de *quorum sensing* în formarea biofilmului de către o specie Gram negativă. Deşi celulele planctonice secretă semnale chimice (HSL – homoserin lactone), concentraţia scăzută a moleculelor de semnalizare nu modifică expresia genică. În biofilm densitatea celulară este mare, astfel încât HSL secretate ating concentraţii mai mari. Moleculele HSL sunt recepţionate de celulele din biofilm şi determină schimbări în activitatea genetică a celulei (după Costerton şi Dircks, 2004).

Rolul feromonilor nu se limitează numai la controlul bioluminiscenţei, ci şi al altor procese fiziologice extrem de variate: (i) expresia coordonată a anumitor factori de virulenţă de către bacteriile patogene sau oportuniste ca răspuns la contactul cu celulele eucariote ale gazdei sensibile, inclusiv formarea biofilmelor mature, care implică procese de „diferenţiere" a celulelor incluse în biofilm (fig. 41), (ii) inducerea competenţei pentru procesul de transformare bacteriană, (iii) sporularea, (iv) transferul plasmidelor conjugative, (v) procese metabolice dependente de densitatea celulară, (vi) biosinteza antibioticelor, (vii) motilitatea (*twitching, swarming, swirming*).

Deoarece unul dintre cele mai importante roluri ale mecanismelor de QS, atât la bacteriile Gram negative, cât şi la cele Gram pozitive, este reprezentat de reglarea expresiei coordonate a factorilor de virulenţă şi evitarea mecanismelor de apărare antiinfecţioase ale gazdei, în prezent aceste mecanisme reprezintă ţinta dezvoltării unor noi strategii anti-patogenice, bazate pe blocarea mecanismelor de semnalizare intercelulară la diferite niveluri (blocarea sintezei moleculelor de semnalizare prin administrarea unor analogi ai acestora, inhibarea propagării semnalului mediat de feromoni prin diminuarea concentraţiei extracelulare a acestora, inhibarea recepţionării semnalelor prin utilizarea unor molecule competitive (cu structură asemănătoare feromonilor bacterieni) sau necompetitive (cu structură chimică diferită) capabile să interfere cu legarea moleculelor de semnalizare la proteina senzor sau cu transmiterea semnalului la proteina reglatoare.

Una dintre cele mai importante consecinţe ale formării biofilmelor este rezistenţa crescută a celulelor incluse în biofilm, atât la mecanismele de apărare ale gazdei, cât şi la dozele convenţionale de antibiotice şi biocizi, celulele manifestând proprietatea de rezistenţă faţă de substanţele antimicrobiene. Mecanismul protecţiei sau rezistenţei la factorii antimicrobieni, pentru care termenul mai corect ar fi *toleranţă* sau *rezistenţă fenotipică* (foarte diferită de rezistenţa propriu-zisă la antibiotice, determinată genetic) este subiectul unor dezbateri curente.

Au fost emise mai multe ipoteze, care au formulat factorii determinanţi ai rezistenţei comportamentale, diferiţi de factorii genetici de rezistenţă (fig. 42):

- aderența la substrat și agregarea bacteriilor între ele;
- exopolimerii secretați care protejează celulele; această ipoteză, formulată adesea în trecut, conform căreia structura mucoidă ar constitui o barieră de difuzie față de moleculele antimicrobiene, este respinsă azi de unii autori;
- enzimele degradative, fie provenind de la o singură specie și acumulate în concentrații mari, fie, provenind de la specii diferite și acționând sinergic;
- aderența celulară însăși determină modificări fiziologice (intrarea în stare de latență metabolică a celulelor din straturile profunde ale biofilmului, subexprimarea porinelor, supraexprimarea pompelor de eflux)

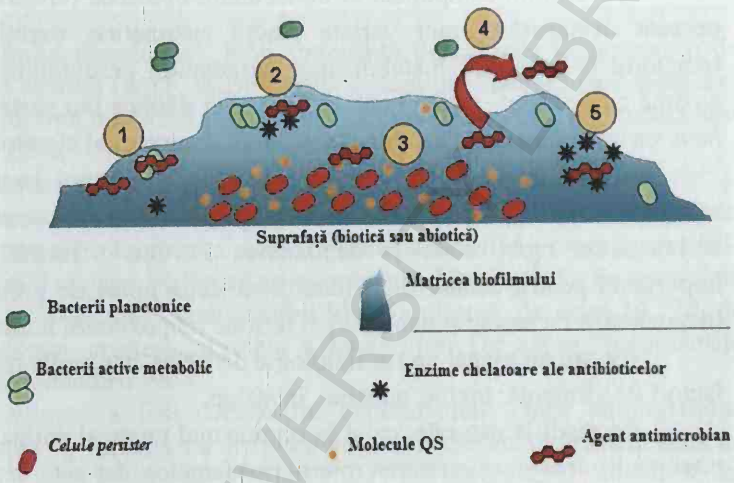


Fig. 42. Mecanismele rezistenței biofilmelor la antibiotice: 1) permeabilitatea redusă a matricei biofilmului pentru antibiotice, care acționează doar la nivelul straturilor superficiale; 2) activitate redusă a antibioticelor datorită condițiilor locale (reziduuri microbiene, pH, pCO_2, pO_2 etc); 3) distrugerea antibioticului de către enzimele inactivatoare acumulate în interiorul biofilmului; rata de creștere redusă a celulelor din biofilm (populație *persister*); 4) eliminarea activă a antibioticului prin intermediul pompelor de eflux exprimate de celulele crescute în biofilm; 5) activarea răspunsului la stres care se manifestă prin supra-exprimarea unor mecanisme de rezistență la antibiotice (de exemplu, enzime inactivatoare) (după Pozo și Patel, 2007).

Biofilmele microbiene sunt implicate în generarea infecțiilor cronice, persistente, greu de tratat, consecutiv formării biofilmelor pe țesuturi (endocadita valvulară, otita medie, fibroza chistică, prostatita bacteriană cronică, periodontita) sau pe dispozitive medicale (valve cardiace artificiale (protetice), catetere centrale venoase, catetere urinare, lentile de contact, dispozitive intrauterine) (fig. 43).

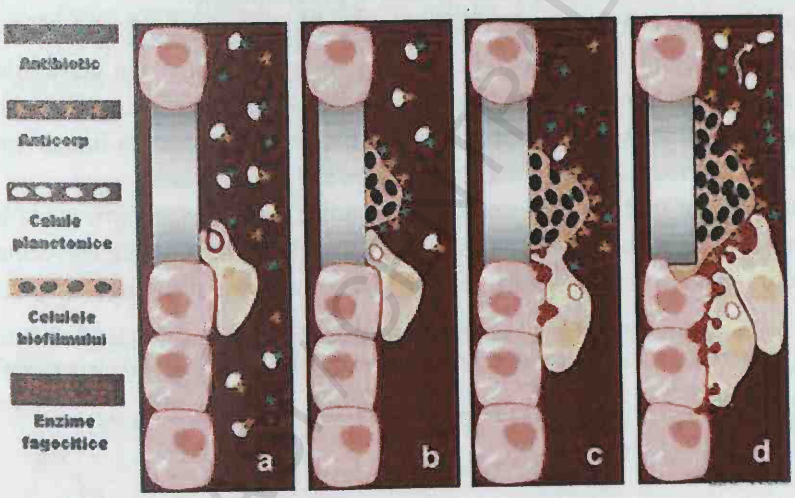


Fig. 43. Interacțiunea unui biofilm microbian cu efectorii imunitari ai gazdei. Bacteriile planctonice pot fi eliminate de anticorpi și fagocite și sunt sensibile la antibiotice. b. Celulele bacteriene aderate formează biofilme, preferențial pe suprafețe inerte. Comunitățile sesile sunt rezistente la anticorpi, fagocite și antibiotice. c. Fagocitele sunt atrase de biofilme. Biofilmul nu poate fi fagocitat, dar fagocitele își eli-berează enzimele lizosomale în mediul extracelular. d. Enzimele fagocitelor lezează țesutul din jurul biofilmului și celulele planctonice sunt eliberate din biofilm. Eliberarea lor poate determina diseminarea și infecția acută în țesutul învecinat (după Costerton et al., 1999).

4.3. Sideroforii –factori de virulență

Fierul, deși este al IV-lea metal al planetei din punct de vedere cantitativ, se găsește majoritar sub forma hidroxizilor insolubili. Fe este substanța minerală esențială pentru toate celulele eucariote și procariote, dar este toxic în concentrație mare. În cele mai multe habitate Fe^{2+} este instabil, fiind oxidat la Fe^{3+}, fie spontan prin reacția cu O_2 molecular, fie pe cale enzimatică, în reacțiile metabolice. În mediile naturale, în prezența O_2 și a H_2O, la pH neutru și alcalin, Fe^{3+} formează oxidul feric hidratat

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIOLOGIE

(Fe_2O_3. nH_2O) sau este legat de *agenți chelatori* (compuși chimici în care un ion metalic multivalent este captat, sechestrat și legat în structura ciclică a agentului chelator). În organismul uman și animal, Fe este legat stabil de diferite proteine: hemoproteinele (hemoglobina, mioglobina) leagă circa 2/3 din cantitatea totală de Fe, în hem.

Multiplicarea bacteriilor în țesuturile gazdei este limitată de mecanismele de apărare ale gazdei și este condiționată de capacitatea de a-și obține nutrienții. Bacteriile necesită prezența obligatorie a Fe^{2+} (forma accesibilă metabolismului), cu excepția lactobacililor. Fe^{2+} se găsește în structura chimică a tuturor tipurilor de celule.

Fe este un component al moleculelor esențiale (citocromi, ribonucleotid-reductaza etc.), fiind necesar desfășurării unor variate reacții enzimatice, esențiale pentru creștere: replicarea ADN, transferul electronilor, metabolismul oxigenului, peroxidului și radicalului superoxid (SOD este o enzimă cu Fe); Fe^{2+} este un cofactor de sine stătător sau parte a unui grup prostetic, în special de tip *hem,* ca un component esențial al catenei de transport al electronilor în membrana celulară.

Fierul poate fi defavorabil pentru metabolismul bacterian: radicalii liberi $OH^{\cdot}$ generați în reacțiile Haber-Weiss, catalizate de Fe, se pot acumula, consecința fiind moartea celulei. De aceea, sechestrarea, mobilizarea și depozitarea Fe într-o formă netoxică, biodisponibilă, este foarte importantă pentru celulă. S-au identificat două tipuri de proteine de depozit al Fe: *bacterioferitina* (depozitează Fe hemic și nehemic) și feritina (depozitează numai Fe nehemic).

Fe are nu numai un rol fiziologic deosebit, dar multe bacterii îl utilizează pentru activarea unor factori de virulență: toxine, adezine, invazine.

În mediile naturale, ca și în organismul uman și animal, Fe se găsește în cantități suficient de mari pentru a asigura creșterea microorganismelor, dar este în forme inaccesibile. Astfel, concentrația normală a Fe în plasma mamiferelor (mai mică de 10 μM) este satisfăcătoare pentru creșterea și multiplicarea bacteriilor, dar numeroși factori îl fac inaccesibil microorganismelor. Practic, Fe disponibil lipsește, deoarece este chelat de proteine care-l leagă cu mare afinitate sau este component al eritrocitelor. Un deficit parțial al Fe are efect bacteriostatic, iar deficitul major are efecte letale, prin inhibiția sintezei proteinelor. Fe anorganic este insolubil în aerobioză la pH fiziologic.

De aceea, sinteza componentelor celulare care utilizează Fe este controlată prin diferiți parametri, care acționează în diferite condiții fiziologice și de mediu, în sens negativ (în condițiile excesului de Fe în mediu) sau în sens pozitiv (în condițiile limitante ale Fe). Concentrațiile mari ale Fe duc la stoparea expresiei multor gene implicate în înglobare. În condițiile limitării Fe, intră în acțiune mecanismele reglatoare pozitive.

În organismul uman și animal, Fe este legat în complexe organice cu *proteine intracelulare* (feritina, hemosiderina, gruparea hem din hemoglobină sau din mioglobină), cu *glicoproteine extracelulare* (lactoferina din secreții – lapte, salivă, lacrimi), precum și cu *transferina* din sânge și limfă.

* Cea mai mare parte a transferinei se sintetizează în ficat și este eliberată în fluidele organismului. Ea leagă Fe feric la locul absorbției și-l transportă la locul utilizării. Celulele mamaliene reglează concentrația Fe intracelular, prin intermediul a două proteine:
- o proteină de import al Fe, cu rol de *receptor de transferină;*
- proteină de depozit al Fe, reprezentată de *feritina.*

Transferina pătrunde în celulă prin intermediul receptorului membranar specific. După ce celula importă transferina, Fe este încorporat în proteinele celulare (citocromi etc.), iar excesul este depozitat ca feritină. Când celula necesită o cantitate mai mare de Fe, crește densitatea receptorului de transferină și astfel celula preia o cantitate mai mare de Fe din mediul extracelular și reduce concentrația de feritină.

Dacă Fe se acumulează în exces în celulă, scade densitatea receptorilor de transferină și crește cantitatea de feritină.

În plasmă, hemoglobina (Hbg) este complexată cu alte proteine ca haptoglobina*, iar cantități mici de hem pot fi legate de albumină sau de hemopexină. Fierul intracelular poate fi asociat cu Hbg, transferina sau cu lactoferina sau este depozitat sub forma feritinei.

*Haptoglobina este o proteină din setul reactanților de fază acută. Se sintetizează în ficat și are rolul de a îndepărta hemoglobina liberă, rezultată prin hemoliza intravasculară. Se formează un complex stabil, ireversibil, care este epurat rapid de hepatocite. După leziunea tisulară, haptoglobina crește de 2–4 ori și se găsește în exsudatul inflamator. Nivelul scăzut de haptoglobină are semnificație clinică după vârsta de un an și se poate datora insuficienței hepatice, dar la majoritatea pacienților, cauza este hemoliza intravasculară și rata rapidă de *clearance* a complexelor haptoglobină-hemoglobină. Nu există o corelare cantitativă între nivelul haptoglobinei plasmatice și amploarea hemolizei, deoarece chiar o hemoliză minoră diminuează masiv cantitatea de haptoglobină. Dacă pacientul este în faza acută a unui proces infecțios sau inflamator de altă natură, nivelul "normal" al haptoglobinei nu exclude diagnosticul de hemoliză.

Lactoferina face parte din familia transferinei. Este sintetizată de celulele fagocitare și de hepatocite. În stare liberă se găsește în secreții (lapte, lacrimi, salivă, secreția mucoasă care tapetează epiteliile). Neutrofilele eliberează lactoferina în situsul inflamator. Identitatea secvenței aminoacizilor dintre lactoferină și transferină este de 60%.

Proteinele care leagă Fe au afinitate înaltă, au constante înalte de legare, de aproximativ 10^{36} și în mod normal sunt parțial saturate. De exemplu, *feritina* leagă circa 4500 atomi de Fe^{3+}/moleculă, iar *transferina**, proteina majoră de transport a Fe în plasma sanguină, este saturată în proporție de 30%.

Transferina și lactoferina conțin 2 situsuri de legare a Fe/moleculă. Homeostazia Fe controlată riguros, are ca rezultat o concentrație scăzută a Fe biodisponibil liber în plasmă, de circa 10^{-24}M, de câteva ori mai mic decât nivelul necesar creșterii normale a bacteriilor. De aceea, organismele patogene sunt strict limitate în privința dobândirii Fe.

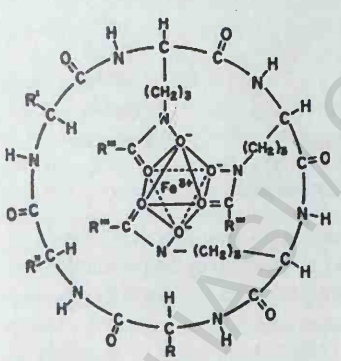
Rolul Fe în patogeneza infecțioasă a fost demonstrat experimental. După administrarea parenterală a Fe la cobai, sensibilitatea la infecția cu *K. pneumoniae* a crescut dramatic, ceea ce demonstrează rolul aprovizionării cu Fe asupra patogenezei bacteriilor. De aceea, serul sanguin uman este bacteriostatic.

În timpul evoluției, cantitatea restrictivă de Fe disponibil a creat mecanisme specializate pentru utilizarea resurselor de Fe, prin contact direct sau indirect. Bacteriile și-au elaborat mecanisme adaptative prin care mobilizează Fe și îl disponibilizează pentru activitățile celulei. Bacteriile preiau Fe din transferină, lactoferină, hemoglobină și din complexele hemoglobină-haptoglobină, iar cele cu localizare intracelulară, din rezerva celulei.

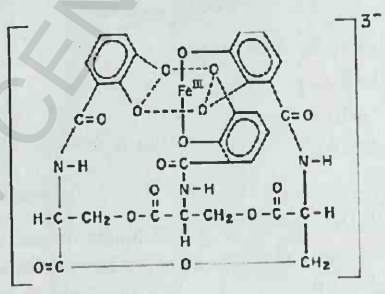
L. monocytogenes produce o reductază a Fe^{3+} la Fe^{2+} și astfel Fe este eliberat din glicoproteinele chelatoare intracelulare.

Se recunosc două mecanisme prin care bacteriile dobândesc Fe:

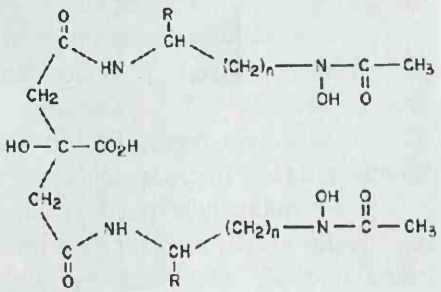
- mecanismul preluării indirecte prin intermediul sideroforilor;
- mecanismul preluării directe a Fe prin receptorii celulari care leagă proteinele cu Fe.



Structura ferocromului, exemplul tipic al unui siderofor de tip hidroxamat. $R = R' = R'' = H$; $R''' = CH_3$ (Neilands, 1995).



Structura enterobactinei ferice, exemplul tipic al unui siderofor de tip catechol (cele 3 inele catechol asigură legarea coordinativă a Fe) (Neilands, 1995).



Structura aerobactinei, exemplu tipic al unui siderofor de tip citrat-hidroxamat (Neilands, 1995).

Sideroforii sunt agenți chelatori sintetizați și secretați de microorganismele procariote și eucariote (și chiar de plantele superioare), care intră în competiție pentru legarea Fe, cu proteinele

gazdei care sechestrează Fe. Denumirea generală a agenților chelatori bacterieni este cea de *siderofori*. Sideroforii sunt molecule mici (600 Da), difuzibile, secretate de multe microorganisme, în condițiile scăderii concentrației de Fe biodisponibil, care au în structura lor, grupări caracteristice de tipul *catechol, fenolat* sau *hidroxamat*. Structura moleculară caracteristică, definită funcțional ca o "cușcă moleculară", are rolul de *a lega* Fe^{3+} (feric) din mediul extracelular. Sideroforii sunt secretați prin pompele de eflux ale suprafamiliei MFS (*major facilitator superfamily*).

Sinteza sideroforilor este catalizată de sintetaze neribosomale, un complex multienzimatic care activează și asamblează un spectru larg de aminoacizi, ceea ce are ca rezultat diversitatea structurală înaltă a peptidelor macrociclice.

Sideroforii secretați formează complexe stabile cu Fe^{3+} extracelular.

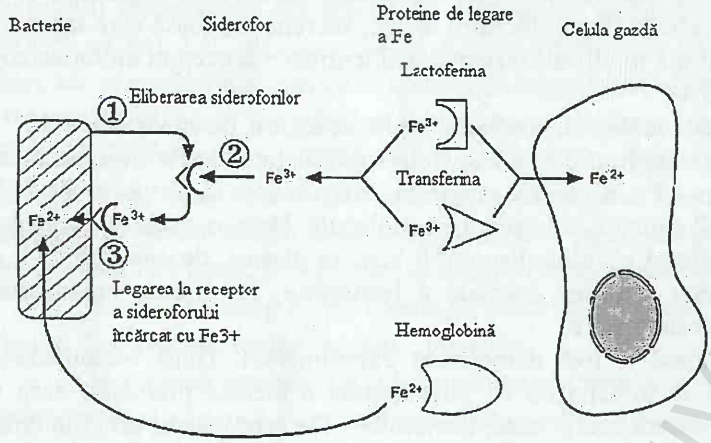


Fig. 44a. Mecanismul preluării Fe de către siderofori (Baron, 1996).

Ulterior, complexul siderofor – Fe^{3+} este recunoscut de un receptor situat în membrana externă, dar nu poate trece prin canalele membranei celulei bacteriene datorită dimensiunilor sale. Transferul membranar al Fe^{3+} mediat de receptor, este asociat cu reducerea lui la forma feroasă (Fe^{2+}), iar sideroforul rămâne la nivelul receptorului (fig. 44 a, b). La bacteriile Gram pozitive, complexele Fe-siderofor sunt recunoscute selectiv de receptori membranari și transportate în celulă cu consumul ATP. În celulă, complexul Fe-siderofor se disociază prin hidroliza sideroforului și/reducerea ionului feric la Fe^{2+} (feros), care este depozitat în bacterioferitină, utilizată ca un cofactor în câteva procese celulare vitale. Fe este legat în centrul sideroforilor cu o afinitate echivalentă celei de legare cu transferina.

Sideroforii se găsesc nu numai la bacteriile patogene, ci constituie mecanisme eficiente de preluare a Fe în tot regnul procariotelor. În funcție de specie, ei sunt factori cu diferite grade de virulență. Sideroforii pot prelua ionii de Fe chiar din compuși minerali, ca hematita.

O modalitate frecventă de preluare a Fe este utilizarea xenosideroforilor, funcțională la *S. cerevisiae,* adică microorganismele preiau Fe din sideroforii sintetizați de alte microorganisme.

Fe intracelular poate fi obținut prin liza celulei gazdă, mediată de citolizine sau hemolizine. Se eliberează Fe, hemul sau Hbg. Unele bacterii folosesc Fe din celulele care degenerează la suprafața epiteliilor mucoase.

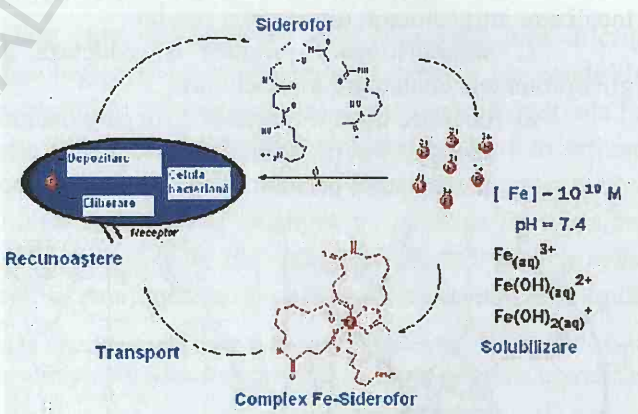


Fig. 44b. Ilustrarea mecanismului prin care sideroforii funcționează ca mediatori ai cantității de Fe disponibil (//www.chem.duke.edu/~alc/labgroup/research).

S-a constatat că genele pentru aerobactin la *Shigella sp.* sunt represate *in vivo,* în interiorul macrofagelor. Totuși, unele bacterii intracelulare secretă molecule *siderofor-like* capabile să penetreze vacuola, să se încarce cu Fe din citoplasmă și să se întoarcă în vacuolă. Vacuolele parazitare pot fuziona cu vezicule de exocitoză sau endocitoză care conțin Fe și îl utilizează. Unii paraziți (*Toxoplasma*) pot induce formarea porilor în membrana vacuolară, permițând moleculelor gazdei (care transportă Fe) să pătrundă în interiorul vacuolei.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Speciile de *Neisseria* şi *Prevotella (Bacteroides)* elimină proteaze specifice care degradează transferina şi eliberează Fe.

Mecanismele *directe* de preluare a Fe constau în înglobarea surselor de Fe (lactoferina, transferina, feritina, hemul şi/sau hemoproteinele). Dezavantajul este că mecanismele directe necesită existenţa receptorilor specifici pentru fiecare sursă de Fe, iar structura chimică a surselor este diferită de la un compartiment la altul al gazdei. Mecanismul de preluare directă a Fe este propriu unor bacterii patogene care colonizează mucoasele (*Neisseria sp., Bordetella sp., H. influenzae, M. catarrhalis, Actinobacillus pleuropneumoniae*). Ele nu secretă siderofori, dar preiau Fe prin contactul selectiv între componentele membranei externe, cu proteinele care leagă Fe (transferina, lactoferina sau chiar hemoglobina). *Neisseria* sp. şi *H. influenzae* utilizează ca surse de Fe numai transferina şi lactoferina umană, ceea ce ar explica specificitatea lor pentru gazdele primate.

Receptorul pentru hemoglobină de la *N. gonorrhoeae* leagă preferenţial, dar nu exclusiv, hemoglobina umană, scoate hemul şi-l transferă în spaţiul periplasmic. Printr-un mecanism necunoscut, este internalizat numai hemul, iar hemoglobina rămâne la exterior. În citoplasmă, unele bacterii au enzime omologe oxigenazei hemice umane, care degradează hemul la α-biliverdină, cu eliberarea Fe şi CO*.

* Toxicitatea CO pentru om se atribuie afinităţii înalte pentru toate proteinele ce conţin Fe hemic, scăzând capacitatea hemoglobinei de a lega O_2. CO este inhibitor al enzimelor cu Fe nehemic, inclusiv hidrogenaza şi nitrogenaza. Mamiferele produc CO endogen prin degradarea hemului. Hbg discriminează între CO endogen şi exogen. Fără discriminare, CO de origine endogenă s-ar lega cu 20% din proteinele cu hem din organism.

4.4. Agresivitatea (Invazivitatea)

Puterea de invazie (agresivitatea sau invazivitatea) reprezintă capacitatea agenţilor patogeni de a depăşi prin mecanisme specifice, barierele epiteliale, de a pătrunde în ţesuturile gazdei şi de a se multiplica, producând efecte patologice. Microorganismele invazive au capacitatea de a pătrunde prin mijloace proprii în ţesuturile gazdei sau de a stimula funcţia endocitară a substratului şi de a-şi păstra viabilitatea în mediul gazdei (fig. 45).

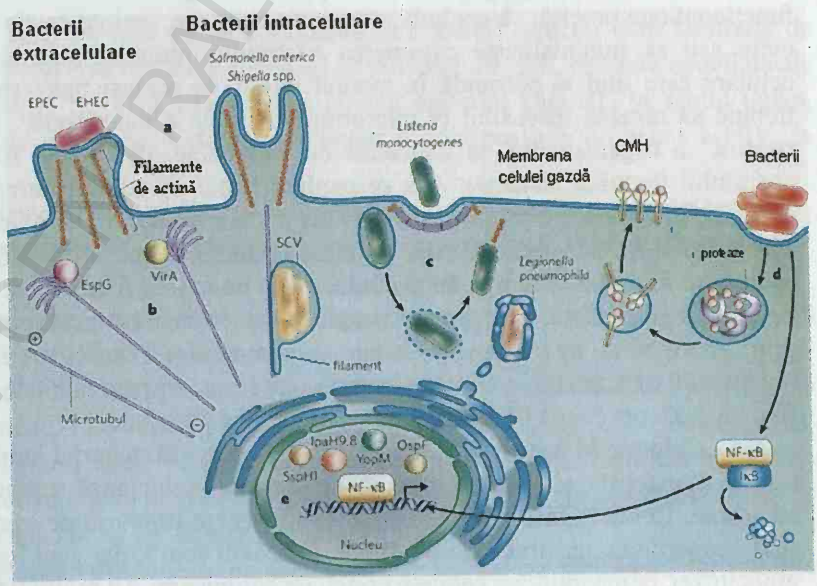


Fig. 45. Biologia celulară a procesului infecţios indus de bacterii extra- şi intracelulare. a, b. Reorganizarea citoscheletului; c. Pătrunderea în citoplasma celulei gazdă prin endocitoză; d. Evitarea mecanismelor de apărare prin prezentarea antigenelor bacteriene asociate cu moleculele CMH, modificarea expresiei genelor pentru molecule proinflamatorii (de exemplu, NF-kB); e. Acţiunea directă a moleculelor bacteriene injectate prin mecanismul SST III asupra nucleului celulei gazdă (după Bhavsar et al., 2007).

Invazia este modalitatea prin care microorganismele infecţioase sparg barierele epiteliale ale gazdei. Multe bacterii patogene au capacitatea de a supravieţui în interiorul celulei eucariote. Ele pătrund în celule care în mod obişnuit nu sunt fagocitare (celulele mucoase, celulele endoteliale ale vaselor sanguine). Mediul intracelular oferă protecţie microorganismului, care ori se multiplică ori persistă.

EUSAPIENTIA UNIVERSITY BRAT

În general, organismele invazive aderă la celula gazdă prin intermediul unei clase de molecule de adezine, denumite *invazine*, care orientează intrarea bacteriei în celulă. Mecanismele de aderență declanșează sau stimulează semnalele celulare, care direct sau indirect ușurează intrarea bacteriei. Invazia este un eveniment activ, susținut de funcțiile normale ale celulei. Suportul procesului de invazie și înglobare este citoscheletul celulei gazdă.

Puține specii bacteriene sunt capabile să forțeze intrarea directă în celula gazdă, printr-o digestie enzimatică locală a membranei celulei gazdă, după aderență. De exemplu, *R. prowazecki* secretă fosfolipaze care produc degradarea localizată și controlată a membranei celulei gazdă. Prin leziunile membranare, agentul patogen intră direct în citoplasmă.

În categoria *invazinelor* intră o categorie de proteine asociate suprafeței celulare, dar și apendicele celulare evidențiate la microscopul electronic (fimbrii și flageli) sau cele care constituie un strat fin, înalt organizat, pe suprafața celulei. Invazinele ușurează răspândirea bacteriilor în organism, după fixarea și multiplicarea lor la poarta de intrare.

Flagelii ca organite de motilitate sunt în același timp invazine, deoarece conferă un avantaj evident celulelor bacteriene care trebuie să traverseze stratul vâscos de mucus, pentru a ajunge la celulele epiteliale ale tractului digestiv sau respirator.

Fimbriile, la bacteriile patogene, au rol de adezine bacteriene, dar în aceiași măsură ele constituie și un factor de agresivitate, deoarece conferă un grad de protecție a celulei față de factorii de apărare ai gazdei.

Unele invazine produc efect *necrotic* sau determină alte modificări care favorizează colonizarea tisulară progresivă. De exemplu, unele bacterii produc *hialuronidaza* și alte enzime care hidrolizează polimerii din substanța fundamentală a țesutului conjunctiv, favorizând astfel invadarea vaselor sanguine și limfatice.

Agenții patogeni au elaborat strategii care le permit să invadeze suprafețele mucoase. Aderența selectivă de celulele M este o modalitate eficientă de invazie. Bacteriile și virusurile care utilizează calea de transport a celulelor M, pot infecta mucoasa digestivă și se pot disemina sistemic.

Celulele M (*M*icrofold), care acoperă plăcile Peyer reprezintă o specializare locală a epiteliului intestinal. Ele separă foliculii limfoizi asociați epiteliului, de lumenul intestinal. Plăcile Peyer, formate din foliculi limfoizi agregați, sunt componenta majoră a sistemului imunitar al mucoaselor și au o funcționalitate precisă: să excludă antigenele exogene, înainte ca ele să pătrundă în mediul intern și să evite sau să minimalizeze expunerea aparatului imunitar sistemic, la antigenele moleculare sau celulare care tind să pătrundă în mediul intern. În același timp, țesutul limfoid asociat mucoaselor trebuie să rămână insensibil la microbiota normală a mucoaselor. MALT are calitatea de "zonă de control" a organismului, la contactul cu antigenele, dar are și rol reglator asupra funcționalității aparatului imunitar sistemic. Așa se explică faptul că administrarea orală a unui antigen la om sau animale, în esență, nu produce un răspuns imun sistemic, ci de obicei, un răspuns imun al mucoasei. Mecanismul nu este cunoscut, dar sistemul imunitar al mucoaselor împiedică răspunsul imun amplu al aparatului imunitar sistemic, după contactul cu un număr foarte mare de antigene intestinale, în special de origine alimentară. Antigenele complexe bacteriene sau virale pot iniția un răspuns imun complex, prin intermediul aparatului imunitar al mucoaselor. Deficiențele funcționale ale MALT expun organismul și aparatul imunitar sistemic, unei permanente stări de activare, care depășește limitele fiziologice, consecința fiind instalarea maladiilor autoimune.

Celulele M acoperă plăcile Peyer și pinocitează material luminal sub formă solubilă, pe care îl transferă macrofagelor subiacente. Macrofagele prelucrează antigenele și le prezintă limfocitelor adiacente. Celulele M sunt considerate ca un sistem timpuriu de avertizare a sistemului imunitar. Ele sunt acoperite cu un strat mucos subțire, microvili scurți, dar sunt foarte active din punct de vedere al pinocitozei, comparativ cu celulele epiteliale columnare. Au puțini lizosomi și materialele înglobate nu sunt supuse degradării. Deși celulele M au evoluat ca un sistem protector strategic, proprietățile lor funcționale le conferă calitatea unor adevărate porți de intrare – un călcâi al lui Achile al intestinului, deoarece bacteriile patogene dobândesc acces spre structurile profunde.

Celulele M transportă macromolecule, particule și microorganisme, direct în mediul celular al foliculilor limfoizi ai mucoasei. Ele nu au receptori pentru imunoglobulinele polimerice, adică nu transferă IgA, ceea ce favorizează accesul antigenelor la suprafața mucoasei. Prin epiteliul folicular,

microorganismele dobândesc acces la structurile limfoide ale foliculului. Consecința este benefică, deoarece, astfel se inițiază răspunsul imun protector față de microorganismele luminale. Din acest punct de vedere, celulele M formează un sistem de avertizare timpurie.

Celulele M ale foliculilor sunt specializate pentru transportul transepitelial. Suprafața bazolaterală a celulelor M este intruzată profund, formând un "buzunar" mare, intraepitelial, în care sunt eliberate particulele și macromoleculele transportate. Celulele M au prelungiri bazale de circa 10 μm, ce se extind în țesutul limfoid subiacent și stabilesc contacte directe cu celulele limfoide sau cu celulele prezentatoare de antigen. Celulele din pliul membranar al celulei M sunt limfocite T CD_4 cu receptor de tip αβ, limfocite B și un număr mic de macrofage. Puține limfocite T sunt de memorie sau neangajate (naive). Pliul celulei M este situsul interacțiunii celulelor T, cu celulele ce prezintă antigenul (limfocite B și macrofage).

Macrofagele și celulele dendritice au probabil rolul de a îngloba agenții patogeni transportați de celulele M, de a prelucra și depozita antigenele.

Interacțiunea agenților patogeni cu celula M variază larg, de la transportul simplu, până la distrugerea celulelor epiteliale foliculare. Virusurile care aderă de celulele M declanșează procesul de endocitoză, iar bacteriile modifică enzimatic suprafața celulelor epiteliale M, induc semnalul declanșator al internalizării și alterează bariera epitelială.

Pătrunderea virusurilor prin celulele M

Celulele M preiau virionii aderați și macromoleculele prin mecanismul endocitozei, pe calea veziculelor tapetate cu clatrină. Materialele neaderente sunt preluate prin endocitoză în faza fluidă, în vezicule tapetate sau netapetate cu clatrină. Particulele mari aderente și bacteriile stimulează procesul de endocitoză, mediat de extensia prelungirilor celulare și reorganizarea filamentelor de actină ale citoscheletului. Nu este cunoscut dacă celulele M participă la prelucrarea și prezentarea antigenelor.

Enterovirusurile pătrund în organism pe cale orală. Poliovirusul de tip I și tulpina Sabin atenuată aderă selectiv la celulele M și se multiplică în plăcile Peyer, înainte de a se disemina sistemic. Deoarece poliovirusul depășește bariera intestinală prin celula M, îi conferă calitatea de vector al unor vaccinuri orale.

Transmiterea sexuală a HIV se face pe cale vaginală sau anală. Infecția este facilitată de leziunile epiteliale, dar HIV poate traversa epiteliile simple și stratificate. *In vivo*, celulele epiteliale ale rectului se pot infecta, dar dovezile nu sunt concludente pentru epiteliul vaginal. În rectul uman, foliculii limfoizi sunt acoperiți de celule M. Celulele M rămân o cale posibilă de acces a HIV, la celulele limfoide subiacente.

Pătrunderea microorganismelor la nivelul epiteliului folicular are și consecințe nefavorabile, deoarece acesta poate fi o cale de acces a microorganismelor patogene (*S. typhi*), la structurile submucoase.

Enterobacteriile au mecanisme proprii de invazie. Agenții patogeni enterici străpung bariera mucoasei intestinului subtire, prin motilitate flagelară, la nivelul celulelor *M*.

Aderența bacteriilor la celulele eucariote necesită recunoașterea oligozaharidelor specifice ale glicoproteinelor. Faptul este evidențiat de rezultatele experimentale *in vitro*: oligozaharidele sunt cei mai puternici inhibitori ai interacțiunii bacteriilor cu suprafața celulei eucariote. Celulele bacteriene interacționează cu celulele M, probabil, prin intermediul glucidelor. Celulele M posedă o diversitate de glicoconjugate, care modulează capacitatea lor de a prelua microorganismele.

Tulpinile de *E. coli* nepatogene din intestin nu aderă selectiv la celulele epiteliale, dar anumite tulpini patogene colonizează mucoasa și interacționează cu celulele M. Aderența la celulele epiteliului intestinal și la celulele M induce dezagregarea microvililor și respectiv a pliurilor celulelor M, odată cu formarea la situsurile de aderență a unor structuri speciale, denumite *piedestale* – consecință a reorganizării filamentelor de actină.

V. cholerae interacționează strâns cu zone extinse ale membranei apicale ale celulei M. Semnalul activator induce reorganizarea actinei submembranare și celula bacteriană este fagocitată

fără lezarea celulei M. Înglobarea de către celulele M nu produce maladia. Agentul patogen nu supraviețuiește în mucoasă și nu se disemineză sistemic.

Înglobarea vibrionilor de către celulele M activează un răspuns imun protector al mucoasei: secreția de sIgA anti-toxină și anti-LPS, care pot preveni colonizarea mucoasei cu *V. cholerae* și implicit maladia diareică.

În intestinul subțire, *V. cholerae* exprimă un grup de adezine proteice prin intermediul cărora aderă de enterocite. Pilii stabilizează coloniile pe suprafața mucoasei, iar toxina holerică induce secreția ionilor de clor, din celulele intestinale în lumen.

Ingestia celulelor de *Salmonella* induce formarea focarelor de infecție în plăcile Peyer. *S. typhi* și *S. typhimurium* aderă rapid și selectiv de celulele M, dar poate invada direct prin epiteliul vilozităților. *Salmonella* invadează enterocitele prin mecanismul fagocitozei în vacuole mari, indusă după dezasamblarea microvililor și reorganizarea citoscheletului apical.

Experiențele cu anse intestinale ligaturate au evidențiat că după 30 de minute de la injectare, *Salmonella* induce creșterea volumului celulelor M, înglobarea rapidă a bacteriilor, urmată de degenerarea celulelor M și accesul celulelor infecțioase la structurile mucoasei.

Yersinia pătrunde în mucoasa intestinală pe calea celulelor M: aderă preferențial la celulele M, este înglobată și traversează citoplasma prin transcitoză.

Shigella, un patogen cu localizare intracelulară facultativă, induce leziuni severe ale mucoasei intestinului și colonului, însoțite de pierderea funcției de barieră a epiteliului. *Shigella* aderă de membrana plasmatică, este fagocitată și, după ruperea membranei fagosomului, este eliberată în citoplasmă, unde bacteriile se multiplică, induc asamblarea unei cozi de filamente de actină și sunt extruzate într-o vacuolă de origine membranară, care este fagocitată ulterior de celulele învecinate.

Experiențele cu enterocite intestinale, *in vitro*, au evidențiat că *S. flexneri* nu invadează suprafața apicală dacă joncțiunile epiteliale înguste sunt intacte. Invazia este posibilă numai prin membrana bazolaterală. *In vivo*, *Shigella* invadează mucoasa, în primul rând, pe calea celulelor M, urmată de invazia celulelor epiteliale prin suprafața bazolaterală. Ulcerările mucoasei au cea mai mare frecvență în ileon și în colon, unde foliculii limfoizi și celulele M sunt mai numeroși.

4.5. Toxigenitatea

Toxigenitatea (toxigeneza) reprezintă capacitatea unui agent patogen de a elabora în cursul creșterii sale, una sau mai multe substanțe toxice. Toxigeneza este o proprietate esențială a patogenității bacteriene.

Sub denumirea de *toxină* sunt cuprinse toate substanțele toxice de proveniență biologică (sintetizate de bacterii, fungi, celule vegetale sau animale). Termenul de "toxină" derivă din cuvântul grecesc "toxicon", care înseamnă *otravă*. Unele sunt secretate de celulele bacteriene în cantități foarte mici, fiind proteine cu acțiune predominant *enzimatică* și poartă denumirea generică de *exotoxine*. Altele, de natură lipopolizaharidică (LPS), care nu au acțiune enzimatică și sunt biologic active la concentrații mult mai mari, aparțin *endotoxinelor*. Se cunosc circa 140 de toxine proteice, din care 2/3 sunt produse de bacteriile Gram-pozitive, dar și de unele specii de bacterii Gram-negative (de exemplu, *Ps. aeruginosa, Sh. dysenteriae, V. cholerae, V. parahaemolyticus, E. coli*). Unele specii bacteriene produc între 5 și 10 tipuri de toxine.

Clasificarea toxinelor bacteriene

Pentru a-și exercita efectul, toxinele trebuie să se elibereze din celule și să se solubilizeze în umorile organismului. După sinteză, toxinele pot rămâne asociate permanent sau temporar cu celula sau sunt eliminate la exterior. Aceste diferențe sunt dependente, în primul rând de specia producătoare, precum și de fazele succesive ale evoluției unei populații bacteriene: faza exponențială, staționară sau de declin. Chiar toxinele care în faza exponențială a culturii bacteriene sunt asociate celulei, în faza de declin se găsesc libere în mediul extracelular datorită lizei celulelor. Din această cauză, studiul raportului topologic între celulă și toxină are semnificație numai pentru faza de evoluție a culturii bacteriene. Din acest punct de vedere se disting următoarele categorii de toxine:

a) *Toxine localizate în celulă* (citoplasmatice) produse de bacterii Gram negative (*Sh. dysenteriae, Y. pestis, B. pertussis, E. coli* etc.) şi Gram pozitive (enterotoxina produsă de *Cl. perfringens*, streptolizina S, pneumolizina produsă de *Str. pneumoniae*, o toxină sintetizată de *Cl. difficile*). Toate sunt de natură proteică. Sunt localizate în citoplasmă sau sunt asociate membranei citoplasmatice şi pot fi eliberate după îndepărtarea peretelui prin liză mecanică sau prin extracţie chimică.

b) *Toxinele constitutive ale peretelui celular*, produse numai de bacteriile Gram negative şi care corespund *endotoxinelor* clasice. Sunt situate în afara membranei citoplasmatice şi fac parte din structura membranei externe a peretelui celular. Din punct de vedere chimic, endotoxinele sunt complexe glicolipidice sau glicolipoproteice. Ele nu sunt niciodată eliberate în cursul fazei de creştere exponenţială, ci numai prin dezagregarea peretelui celular.

c) *Toxinele eliminate* în mediul extern sau *exotoxinele* propriu-zise sunt de natură proteică şi sunt produse mai frecvent de bacteriile Gram pozitive (toxina difterică, toxinele stafilococice, toxina de *B. anthracis* etc.), dar şi de cele Gram negative (*V. cholerae, Ps. aeruginosa*). Exotoxinele îndeplinesc în mod obligatoriu, 3 condiţii:

- se găsesc în mediul de creştere, independente de celula care le-a produs;
- eliberarea lor în mediul extracelular nu necesită autoliza celulei. Celula rămâne viabilă, continuă să crească şi să se multiplice;
- nu se acumulează în celulă.

Aceste criterii se aplică celulelor în faza de creştere exponenţială şi staţionară, deoarece în faza de declin, celulele pot prezenta fenomene de autoliză, independente de sinteza toxinei.

d) *Toxinele cu localizare mixtă* (endocelulară şi exocelulară), în funcţie de faza de evoluţie a culturii bacteriene. În faza exponenţială, toxinele sunt secretate parţial în mediu, dar o fracţie semnificativă rămâne în interiorul celulei şi este eliberată prin autoliză (toxinele tetanică, botulinică).

Mult timp s-a considerat că exotoxinele sunt de natură proteică, iar endotoxinele – de natură lipopolizaharidică. Această diferenţiere nu este netă, deoarece unele toxine proteice aparţin categoriei endotoxinelor, fiindcă rămân asociate celulei producătoare şi invers, uneori, toxinele de natură lipopolizaharidică sunt eliminate la exterior ca exotoxine. De aceea, clasificarea toxinelor trebuie să se facă după criteriul compoziţiei chimice. Din acest punct de vedere, majoritatea exotoxinelor sunt de natură proteică, iar endotoxinele de natură lipopolizaharidică.

Raynaud şi Alouf (1970) au clasificat toxinele în raport cu compoziţia chimică şi cu localizarea celulară.

Grupa I cuprinde toxinele proteice intracitoplasmatice ale bacteriilor Gram negative, eliberate după ruperea mecanică, enzimatică, prin autoliza învelişurilor sau prin extracţie chimică. Sunt sintetizate de *B. pertussis, Sh dysenteriae* (neurotoxina), *Y. pestis*.

Grupa a II-a cuprinde toxinele lipopolizaharidice sau glico-lipo-peptidice (endotoxine), componente structurale ale peretelui celular Gram negativ.

Grupa a III-a cuprinde exotoxinele proteice propriu-zise, produse de *V. cholerae, Cl. tetani, Corynebacterium diphteriae*.

Grupa a IV-a cuprinde toxinele proteice cu localizare intra- şi extracelulară, în cursul fazei logaritmice de creştere: toxinele produse de *Cl. tetani, Cl. botulinum, Cl. oedematiens, Cl.-sordelii*.

Din punctul de vedere exclusiv al compoziţiei chimice, se disting:

1) *Toxine proteice*, reprezentate de exotoxinele produse de bacteriile Gram pozitive şi de toxinele proteice intracelulare ale unor bacterii Gram negative: *B. pertussis, Y. pestis, Sh. dysenteriae* (neurotoxina).

2) *Toxine glico-lipo-polipeptidice*, corespunzătoare endotoxinelor.

În raport cu *tropismul* lor se disting: *neurotoxine, enterotoxine, cardiotoxine*, cu efecte limitate la ţesutul respectiv, sau toxine *pantrope*, cu efecte asupra mai multor categorii de ţesuturi.

Determinismul genetic al sintezei toxinelor

Sinteza toxinelor bacteriene este codificată de gena *tox*, a cărei localizare este cromosomală, plasmidială sau fagică. La *V. cholerae*, subunităţile toxinei holerice sunt codificate de gene cromosomale, asociate cu alte gene ce codifică alţi factori de virulenţă. Astfel de grupe de gene de virulenţă se numesc *insule de patogenitate*. Secvenţa lor diferă mult de a altor gene cromosomale, ceea

ce denotă că ele sunt achiziții relativ recente în evoluție. Ar putea să aibă originea prin integrarea unui element genetic exogen – fagul.

La *Cl. botulinum*, gena *tox*, cu situs cromosomal, prezintă mai multe alele, care codifică sinteza a 7 serotipuri de toxina (notate A --- G), care nu dau reacție încrucișată semnificativă cu anticorpii obținuți față de una dintre ele.

Enterotoxinele și hemolizinele de *E. coli*, toxina dermo-exfoliativă stafilococică sunt codificate de gene plasmidiale.

Gena *tox*, codificatoare a toxinei difterice este localizată în genomul unor bacteriofagi ADN (β, P, 1, W). Activitatea ei este controlată de o genă situată pe cromosomul bacterian.

Fagii purtători ai genei *tox* se găsesc în celulele de *C. diphteriae* în stare integrată (profag), de fag virulent replicativ sau sub forma de replicon autonom represat. Este cunoscut modul de funcționare a genei *tox*, purtată de fagul β, ce se integrează ca profag. Ea se găsește aproape de situsul de inserție a genomului fagic în cromosomul bacterian, dar are propriul său promotor și se poate exprima independent de alte gene fagice, dar poate fi represată fără să influențeze biosinteza altor proteine fagice. Această genă nu pare a fi esențială pentru genomul fagic. Modificarea ei mutațională nu influențează ciclul de multiplicare a fagului. Se consideră că gena *tox* a acestui fag este de origine bacteriană, mobilizată prin procesul de transducție fagică.

Sinteza toxinei eritrogene streptococice (scarlatinoasă), precum și a toxinelor botulinice C și D este codificată de fagi temperați. La *Cl. perfringens*, toxigeneza este legată temporal de procesul sporulării. Sporularea este o condiție obligatorie, dar insuficientă pentru producerea toxinei. Toxina pare a fi un produs al unei gene de sporulare și este o proteină de structură a tunicii sporale.

Căile secreției proteinelor la bacteriile Gram negative

Interacțiunea bacteriilor patogene cu celulele gazdă este caracterizată de factori localizați pe suprafața bacteriei sau secretați în spațiul extracelular.

Proteinele bacteriene secretate sunt numeroase, diferite structural și îndeplinesc o varietate largă de funcții: proteoliza, hemoliza, citotoxicitatea, fosforilarea și defosforilarea proteinelor. Transportul acestor proteine din citoplasmă în spațiul extracelular se face pe mai multe căi.

Pentru bacteriile patogene, termenul de *secreție* (sau export) semnifică transportul activ al proteinelor din citoplasmă, prin membrană, la exteriorul bacteriilor Gram pozitive și respectiv, în spațiul periplasmic la bacteriile Gram negative.

Termenul de *translocație* semnifică transferul unei molecule care rămâne la suprafața celulei bacteriene,-în membrana citoplasmatică sau în stratul mureinic la bacteriile Gram pozitive sau în membrana internă a bacteriilor Gram negative.

Secreția proteinelor urmează o cale comună la bacteriile Gram pozitive și negative, cu implicarea căii generale de secreție (calea Sec-dependentă). După traversarea membranei citoplasmatice, proteinele translocate urmează căi diferite:

- la bacteriile Gram pozitive, proteinele sunt fie eliberate în mediul extracelular, fie încorporate în peretele celular;
- la bacteriile Gram negative, proteinele translocate prin membrana internă sunt eliberate în spațiul periplasmic.

La bacteriile Gram negative s-au descris 5 căi de secreție a proteinelor (I–V) (fig. 47–48).

Sistemele de secreție de tipul 1 (TOSS) sunt sec-independente, implicate în secreția hemolizinelor de *E. coli*, hemolizinei cu funcție adenilat ciclazică (HlyA) și a hemaglutininei filamentoase (FHA) de la *B. pertussis*, a proteazelor alcaline de la *Ps. aeruginosa*, a leucotoxinelor de la *Pasteurela haemolytica*, a metaloproteazei de *Erwinia chrysantemum*. Secreția unei molecule prin TOSS nu necesită secvență semnal, însă necesită 3–4 proteine accesorii care formează un canal transmembranar prin care sunt transportate proteinele secretate. Genele care codifică pentru proteinele accesorii au secvențe apropiate de genele codificatoare pentru moleculele secretate. Moleculele accesorii sunt omologe și adesea interșanjabile. Energia necesară transportului rezultă prin hidroliza ATP (una dintre proteinele accesorii conține un domeniu de legare a ATP), iar regiunea C-terminală a moleculelor secretate codifică informația necesară secreției. Secreția HlyA se face printr-un proces continuu prin membrana internă și externă.

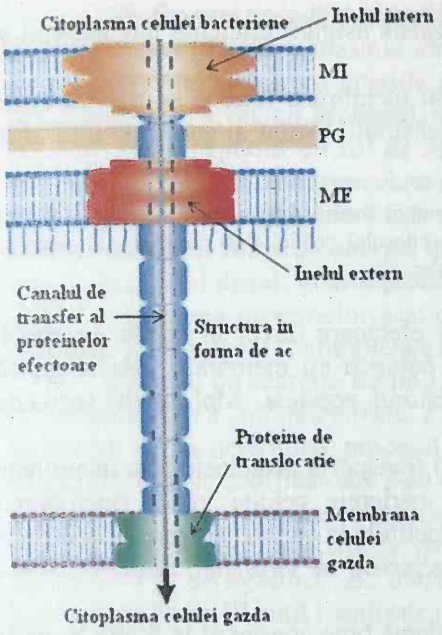


Fig. 46. Structura aciculară proeminentă la suprafaţa unor bacterii patogene, cu rol în translocaţia proteinelor efectoare în citoplasma celulei gazdă. Amănunte în text (după Coburn şi col., 2007).

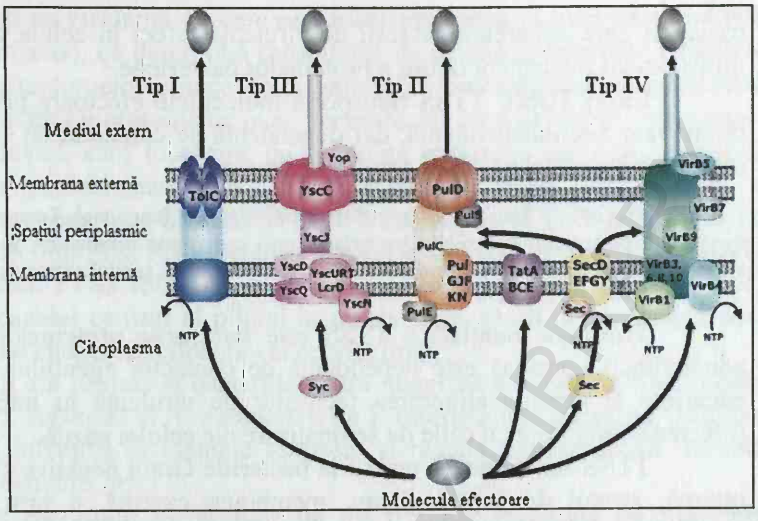


Fig. 47. Reprezentarea schematică a sistemelor de secreţie proteică de tip I, II, III, IV. Calea de tip I este exemplificată pentru hemolizina HlyA de la *E. coli*; sistemul de tip III –exemplificat pentru de secreţia proteinelor de membrană externă –Yop de la *Yersinia*; sistemul de tip II – exemplificat pentru secreţia de pululanaza la *Klebsiella oxytoca*; sistemul de tip IV – exemplificat de de sistemul VirB la *Agrobacterium tumefaciens*. Proteinele HlyB, YscN, SecA şi $VirB_{11}$ au rolul de ATP-aze. Moleculele efectoare secretate sunt reprezentate sub forma ovalelor gri. Sistemele de secreţie de tip II şi IV folosesc chaperonul citoplasmatic SecB. Secreţia de tip III implică chaperoni citoplasmatici (SycE), dar nu interacţionează cu transloconul Sec al membranei interne. Proteinele structurale majore ale fiecărui sistem sunt reprezentate în învelişul celular (după Henderson şi colab., 2004).

Proteinele secretate prin TOSS nu au peptidul *leader* cu rol de semnal, nu sunt supuse clivajului proteolitic, iar semnalul de secreţie este localizat în secvenţa de C-terminală de 60 de aminoacizi a proteinei secretate (C. Hueck, 1998). Nu sunt prelucrate în timpul secreţiei şi nu formează intermediari periplasmici distincţi.

Funcţionalitatea TOSS, exemplificată de α-hemolizina de *E. coli* şi de adenilil-ciclaza de *B. pertussis,* este conferită de 3 proteine: o *proteină a membranei interne* din clasa ABC (ATP binding casette); o *proteină de fuziune* membranară; *o proteină a membranei externe* ce formează un por. Procesul de secreţie este iniţiat după ce un semnal de secreţie de la capătul C-terminal al moleculei destinată secreţiei interacţionează cu proteinele transportoare ABC. Secvenţa semnal este recunoscută specific de transportorul ABC.

Sistemele de secreţie de tipul III (TTSS) funcţionează pentru secreţia specifică a factorilor de virulenţă a unor agenţi patogeni ai omului, animalelor şi plantelor: *Yersinia* spp. (proteina Yops), *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *E. coli EPEC, EHEC (O157 : H7*), *Ps. aeruginosa* (exoenzima S), *Vibrio parahaemolyticus, Bordetella* spp, *Chlamydia trachomatis,* pentru toxinele produse de *Xanthomonas campestris, Ps. solanacearum, Ps. syringae, Erwinia amylovora.*

Proteinele secretate pe *căile de tip I şi III* traversează membranele internă şi externă într-o singură etapă, nu au secvenţă *leader* şi sunt exportate într-o formă nemodificată. Deoarece proteinele exportate nu au secvenţă *leader*, ambele căi sunt independente de sistemul *sec* şi nu implică prelucrarea N-terminală a proteinelor secretate. Secreţia proteinelor pe aceste căi este un proces continuu, fără prezenţa distinctă a intermediarilor periplasmici.

Sistemul de tip III este specializat pentru secreţia factorilor de virulenţă care nu pot difuza şi nu pot pătrunde independent, ci sunt *transferaţi direct în celulă* şi acţionează asupra factorilor intracelulari ai gazdei. În general, expunerea celulelor gazdă la proteine de tip III, în absenţa celulei bacteriene, nu are efect sau efectul este minim. Activitatea unor sisteme de transport de tip III este dependentă sau este stimulată ca răspuns la contactul bacteriei cu celula gazdă. Mecanismul de

transport care eliberează factorii de virulenţă direct în celula gazdă asigură eficienţa interacţiunii şi utilizarea cu randament optim a proteinelor bacteriene.

Ca şi TOSS, TTSS transportă moleculele efectoare prin membrana internă şi externă într-o modalitate Sec-independentă, dar dependentă de contactul cu substratul tisular al gazdei şi are rol în secreţia şi translocaţia* unor proteine bacteriene.

* Secreţia şi translocaţia sunt evenimente distincte funcţional. Termenul de *translocaţie* este folosit pentru a descrie transportul proteinelor din celula bacteriană, prin membrana plasmatică, în citosolul celulei ţintă eucariote, iar *secreţia* semnifică transportul proteinelor din citoplasma bacteriană, în spaţiul extracelular.

Trăsătura esenţială a TTSS este *injectarea* proteinelor efectoare direct în celula eucariotă, adică funcţionarea sa este dependentă de contactul agentului patogen cu membrana celulei gazdă eucariote şi permite eliberarea factorilor de virulenţă în interiorul acesteia. Moleculele secretate (efectoare) interferă cu căile de semnalizare ale celulei gazdă.

TTSS funcţionează numai la bacteriile Gram negative şi transportă proteinele prin membrana internă, stratul de peptidoglican, membrana externă şi prin barierele celulei gazdă (membrana plasmatică şi chiar prin peretele celulei vegetale). TTSS sunt inductibile la contactul agentului patogen cu celula gazdă şi, în esenţă, au rolul *de a transloca factorii bacterieni de virulenţă, direct în celula gazdă* în timpul infecţiei.

Sistemul de secreţie de tip III este un mecanism de virulenţă bine conservat la foarte bacterii Gram negative patogene, dar proteinele secretate sunt foarte diferite. Deşi patogenii posedă şi alţi factori de virulenţă, *sistemul de secreţie de tip III este determinantul esenţial al virulenţei,* deoarece multe dintre proteinele secretate astfel interacţionează direct cu componentele celulare, alterând transducerea semnalelor, sau acţionează în citoplasma celulei eucariote în care sunt translocate.

Dintre miile de proteine bacteriene, doar câteva sunt secretate prin sistemul de secreţie de tip III în spaţiul extracelular sau translocate în celula gazdă.

Sistemul de secreţie de tip III este alcătuit din circa 20 de proteine, majoritatea localizate în membrana internă, asemănătoare cu cele din corpusculul bazal al flagelului bacteriilor Gram pozitive şi Gram negative. De aceea se presupune că sistemul TTSS a apărut prin duplicarea genelor celulare. Aparatul TTSS necesită o ATP-ază, probabil asociată membranei. Transferul din spaţiul periplasmic, prin membrana externă, este mediat de un set restrâns de proteine suplimentare sau pe calea secretorie generală alcătuită din cel puţin 12 proteine.

Semnalul de secreţie este secvenţa de 15–20 de aminoacizi N-terminali ai proteinei secretate. Secvenţele N-terminale ale proteinelor secretate pe calea sistemului de tip III nu sunt asemănătoare.

Unele sisteme de secreţie de tip III asamblează *structuri macromoleculare* la suprafaţa celulei bacteriene, care pot fi implicate în translocaţia moleculelor efectoare în celula eucariotă (fig. 46). Cele mai proeminente sunt structurile cu formă de ac, observate pe imaginile electrono-optice.
La *Salmonella, Shigella* şi *Yersinia*, structurile sunt rigide, luminale, lungi de 45–80 nm, cu rolul de a transloca proteinele în celula gazdă, iar la *E. coli* patogenă, „acul" se extinde cu apendice filamentoase care par să faciliteze ataşarea bacteriei de celula gazdă prin stratul gros de glicocalix. Acul TTSS este aşezat pe o pereche de inele concentrice incluse, unul în membrana internă, celălalt în membrana externă. Cele două inele, asemenea inelelor corpusculului bazal al flagelului, par să formeze o cale de transport directă şi continuă prin membrana internă, stratul peptidoglicanic şi prin membrana externă.

La bacteriile fitopatogene, structura echivalentă acului este asemănătoare pilului (pilul Hrp). Este flexibilă, luminală, cu lungimea de 2 μm, adaptată să traverseze peretele gros al celulei vegetale.

Varietatea maladiilor cauzate de agenţii patogeni la diferite gazde este reflectată de diversitatea proteinelor secretate pe calea sistemului de tip III: unele mediază invazia bacteriei în ţesuturile gazdei, altele paralizează ori omoară celula gazdă.

Sistemul de secreţie de tip III este funcţional pentru biogeneza flagelului la *Ps. aeruginosa*, pentru secreţia proteinei InvA la *Salmonella*, care induce un semnal în celula gazdă ce determină internalizarea bacteriei. InvA este omologă cu MxiA de *Shigella* şi cu LcrD de *Yersinia*, de asemenea cu rol în secreţia factorilor de invazie.

Calea de secreţie de tip III a fost iniţial identificată la *Yersinia*, unde funcţionează pentru secreţia a circa 12 proteine, majoritatea cu rol în virulenţă (proteinele *Yops* - *Yersinia outer proteins*).

Sh. flexneri posedă o plasmidă de virulenţă, pe care sunt localizate circa 15 gene care codifică antigenele *Ipas* (*i*nvasion *p*lasmid *a*ntigen*s*), ce determină capacitatea de invazie a celulelor epiteliale ale mucoasei colonului, cu apariţia simptomelor clinice de dizenterie. *Salmonella* secretă proteinele *Sip* (*Salmonella i*nvasion *p*roteins), omologe proteinelor *Ipas*, necesare invaziei celulelor. Antigenele *Ipas* nu conţin peptidul cu rol de semnal, sunt localizate pe suprafaţa externă a bacteriei, dar şi în mediul extracelular şi sunt transferate în celula gazdă prin TTSS, ca şi antigenele *Sip*.

Multe dintre componentele TTSS sunt omologe proteinelor de la baza flagelului. Câteva proteine de la baza flagelului folosesc energia din hidroliza ATP pentru a propulsa moleculele de flagelină prin lumen, la capătul distal. Foarte probabil, TTSS foloseşte un mecanism asemănător, energizat de ATP, pentru propulsarea proteinelor prin canalul central al pilului în celula ţintă. După ce proteina a fost eliberată, plierea poate fi completată de chaperoni citosolici ai celulei ţintă.

Sistemul de secreţie de tip III s-a păstrat la bacteriile Gram negative *patogene pentru plante* (*E. amylovora, Ps. solanacearum, Ps. syringae* şi *X. campestris sp.*). Interacţiunea agentului patogen cu planta gazdă determină procesul infecţios la plantele sensibile şi reacţia *hipersensibilă** la cele rezistente. Genele codificatoare s-au denumit *hrp*.

La unele organisme, genele aparatului de secreţie de tip III sunt localizate pe plasmide specifice patogenilor, absente la speciile nepatogene. La alţi patogeni (*S. typhimurium, EPEC, Ps. syringae, Ps. aeruginosa, E. amylovora, Xanthomonas*), genele codificatoare ale aparatului de translocaţie de tip III sunt localizate pe cromosom.

* Răspunsul hipersensibil al plantelor rezistente nu are nimic comun cu reacţia de hipersensibilitate a mamiferelor şi se caracterizează prin colapsul rapid şi necroza ţesuturilor care au venit în contact cu agentul patogen, urmată de stoparea progresiei procesului infecţios.

Proteina inductoare a reacţiei hipersensibile la plantele rezistente ("harpin") nu are secvenţa clasică N-terminală şi este asociată cu membrana externă, o situaţie omologă cu a proteinelor *Yops* şi *Ipas*, descrise iniţial ca proteine asociate membranei, înainte de a fi secretate în mediul extracelular.

Practic, toate bacteriile Gram negative patogene pentru plante posedă secvenţe omologe genelor *hrp*, cu excepţia *A. tumefaciens*, care produce procesul patologic printr-un mecanism unic.

Descoperirea genelor de virulenţă la bacteriile patogene pentru mamifere şi la cele patogene pentru plante, a căror secvenţă păstrează un grad semnificativ de omologie, a creat o punte de legătură între cele două domenii de cercetare şi ridică probleme de filiaţie între organisme îndepărtate filogenetic (Gijsegem, 1993).

Căile de secreţie II şi *IV*, dependente de sistemul general de secreţie celulară (Sec-dependente), traversează membrana externă şi internă în etape distincte. La ambele sisteme, exportul prin membrana internă, în spaţiul periplasmic, este mediat de sistemul proteinelor de secreţie – *Sec* – dar diferă prin căile pe care proteinele sunt transportate prin membrana externă.

Proteinele secretate pe căile II şi IV se sintetizează pe ribosomii citoplasmatici ca *preproteine*, cu o secvenţă semnal N-terminală ce orientează proteina spre calea de secreţie Sec a membranei interne. Trăsătura definitorie a exportului proteinelor prin sistemul *sec dependent* este prezenţa unei *secvenţe semnal* de circa 30 de aminoacizi hidrofobi la capătul N-terminal al proteinei. Secvenţa semnal uşurează transportul proteinelor în spaţiul periplasmic şi este ulterior *clivată de o peptidază specifică* (signal-peptidază).

Căile de secreţie *sec-dependente* cuprind un set de proteine localizate în membrana internă, o ATP-ază asociată membranei citoplasmatice (Sec A) ce furnizează energia necesară exportului proteinei şi o proteină chaperon care are rolul de a se lega de proteina ţintă înainte de a fi secretată.

Sistemul de secreţie de tip II este varianta principală a căii secretoare generale (gsp) sec-dependentă, utilizată pentru transportul moleculelor prin membrana internă în spaţiul periplasmic. Proteinele accesorii (circa 14) mediază exportul moleculelor prin membrana externă. Cel mai studiat sistem de secreţie de tip II este al pululanazei la *Klebsiella oxytoca*, alcătuit din cel puţin 7 proteine localizate în membrana citoplasmatică şi alte proteine din membrana externă.

Sistemul de secreţie de tip II este calea principală pentru secreţia enzimelor degradative extracelulare, de către bacteriile Gram negative: elastaza, fosfolipaza C, exotoxina A secretată de *Ps. aeruginosa,* pululanaza la *Klebsiella oxytoca*), o lipoproteină ce hidrolizează amidonul şi care,

după ce este secretată în mediul extern, formează micelii, toxina de *V. cholerae,* proteina pililor de tip IV de la *Ps. aeruginosa.*

Aparatul Sec este alcătuit din mai multe proteine: una dintre ele – Sec A – conține situl de legare la ATP, care prin hidroliză furnizează energia necesară transportului ATP-ază. Alte câteva proteine sunt integrate în membrana internă; o semnal-peptidază clivează o secvență semnal N-terminală implicată în procesul de export al moleculelor în spațiul periplasmic. Aici, restul proteinei adoptă o stare quasi-nativă, facilitată de chaperoni.

Transportul prin membrana externă necesită alte 12–16 proteine accesorii, din clasa celor integrate, ce poartă denumirea generică de secreton.

Calea de secreție de tip IV (TFSS) este funcțională pentru o serie de toxine bacteriene care sunt eliberate din celulă printr-un *mecanism de autotransport.* Autotransportorii utilizează un sistem *sec*-dependent și necesită clivarea unei secvențe semnal pentru translocația prin membrana internă. Proteinele sistemului de secreție de tip IV traversează membrana externă și formează un por prin care trece proteina secretată. Proteinele secretate traversează membrana externă în virtutea secvenței C-terminale, care este îndepărtată enzimatic după ce proteina este eliberată din membrana externă: astfel sunt secretate toxinele-enzime cu activitate *proteazică* specifică ce clivează IgA produse de *N. gonorrhoeae, N. meningitidis, H. influenzae, citotoxina vacuolantă* sintetizată de *Helicobacter pylori, serin-proteaza* de *Serratia marcescens,* o familie de proteine din membrana externă la *B. pertussis,* toxinele secretate de *Sh. flexneri* și de *E. coli* enteropatogenă (EPEC). Sistemul de secreție de tip IV funcționează și la celulele eucariote.

Prototipul acestei căi de secreție este transferul nucleoproteinei T-ADN de la *A. tumefaciens,* în celula vegetală.

Funcțional, TFSS se aseamănă cu aparatul de conjugare: ambele au capacitatea de a transloca proteine, intercelular (de la bacterie la alta sau de la celula bacteriană în celula eucariotă).

Al *V-lea sistem* pentru secreția macromoleculelor (fig. 48) transportă toxine polipeptidice sau complexe ADN-proteine, între două celule bacteriene sau între o celulă bacteriană și o celulă eucariotă: toxina de *B. pertussis; H. pylori* secretă factorul inductor la sintezei IL-8. Aceeași cale este implicată în transferul conjugativ al plasmidelor.

Proteinele pot fi secretate prin sistemul de autotransport (Va) sau pe calea de secreție cu două componente (Vb). Structura primară a proteinei autotransportate cuprinde 3 domenii:

- secvența semnal (*leader*) la capătul N-terminal;
- domeniul α al proteinei transportate, cu funcție efectoare;
- domeniul C-terminal, β, cu rol în autotransport, denumit unitatea de translocare.

Secvența semnal orientează proteina spre membrana internă. După trecerea prin membrana internă, proteina autotransportată se găsește ca formă intermediară, în spațiul periplasmic. Domeniul α rămâne temporar extins în spațiul periplasmic, iar domeniul C-terminal trece în membrana externă. Domeniul α se pliază în periplasmă, înainte sau simultan cu translocația prin membrana externă.

Domeniul β are conformație β-pliată. La capătul C-terminal, aminoacidul este totdeauna fenilalanina sau triptofanul, precedat de resturi alternante hdrofile și hidrofobe.

Prin analogie cu modelul biogenezei porinelor, modelul (Henderson și colab., 2004) presupune că preproteina autotransportată se inseră spontan în membrana externă, în conformație β-pliată, pe măsură ce interacționează cu mediul hidrofob. Domeniile β stabilesc legături de H antiparalele și formează spontan o structură inelară cu diametrul de 2 nm, care constituie porul prin care este transportat domeniul α.

Domeniul efector poate fi prelucrat și eliberat în mediul extern; este clivat și rămâne în contact cu suprafața celulei prin interacțiune necovalentă cu domeniul β sau nu este clivat și rămâne ca o proteină al cărei domeniu C-terminal este ancorat în membrană.

Sursa de energie (ATP sau GTP) nu există în periplasmă, iar la nivelul membranei externe lipsește forța proton-motrice. Forța care controlează translocația domeniului efector prin membrana externă derivă chiar din plierea sa corectă pe suprafața celulei.

Domeniile efectoare ale proteinelor autotransportate sunt foarte diverse, iar funcțional sunt factori de virulență (proteaze, peptidaze, lipaze și esteraze), sunt implicate în motilitate, au rol de adezine, sunt proteine imunomodulatoare, toxine etc.

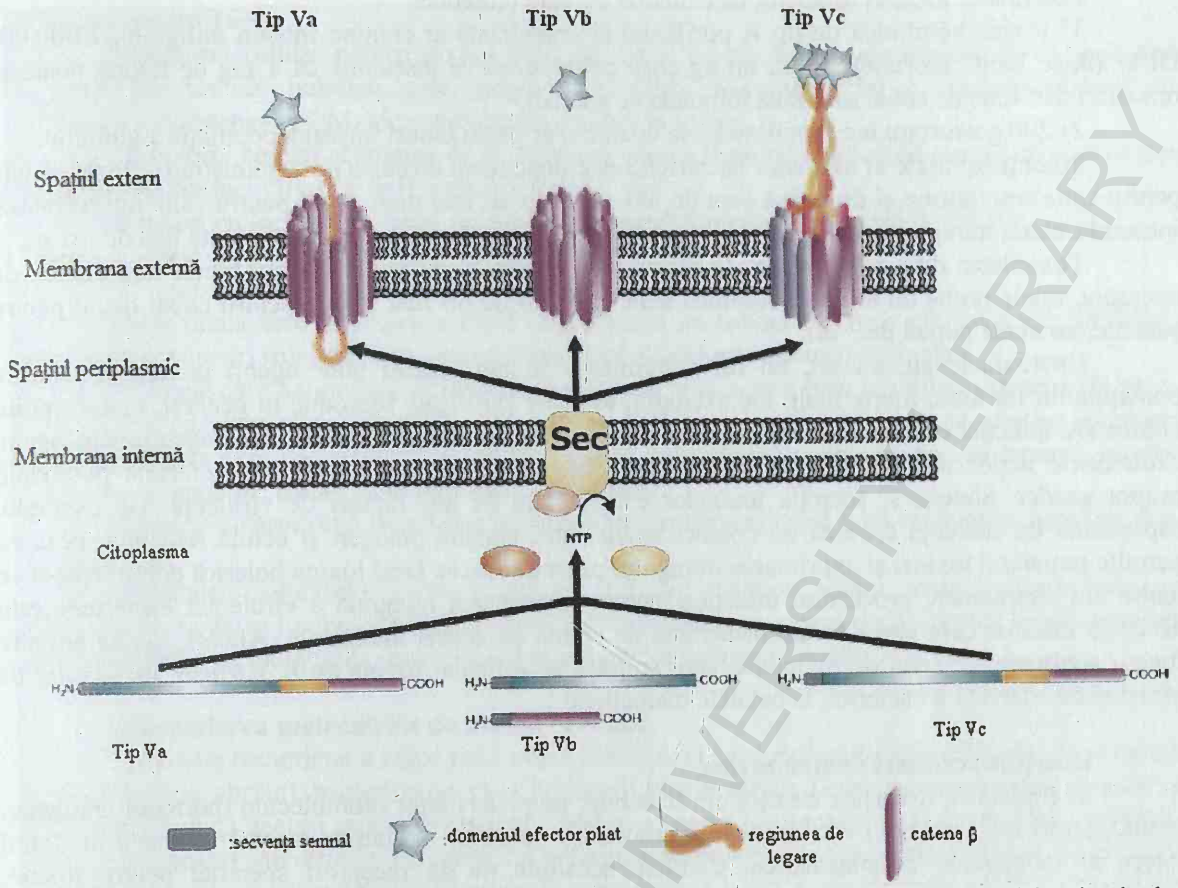


Fig. 48. Reprezentarea schematică a sistemului de secreție de tip V. Sunt reprezentate cele 4 domenii funcționale ale proteinelor: secvența semnal, domeniul efector, regiunea de legare (linker), domeniul β. Poliproteinele autotransportate sunt sintetizate și exportate, în general, prin membrana citoplasmatică *via* aparatul Sec. Secvența semnal este extinsă la toate cele 3 tipuri de secreție tip V. In membrana internă, secvența semnal este clivată și domeniul β se inseră în membrana externă într-o conformație β, formând un por în membrana externă. După dobândirea conformației β, domeniul efector se inseră în por și este translocat la suprafața celulei bacteriene, unde poate să fie sau nu prelucrat ulterior. NTP = nucleozid-trifosfați (ATP, GTP) (după Henderson și colab., 2004).

Mecanismele de autotransport funcționează numai la *Bacteria* și în primul rând la *Proteobacteria* (α, β, γ, ε Proteobacteria), dar și la *Chlamidiae*.

Calea de transport de tip V cu două componente se deosebește de calea autotransportului prin aceea că domeniul α (efector) și domeniul β (transportor ce formează porul) sunt sintetizate ca molecule distincte.

Toxicitatea

Exotoxinele sunt termolabile, au toxicitate foarte înaltă, mai ales în formă purificată, iar prin inactivare rezultă anatoxine. Astfel, toxina botulinică de tip D este de trei milioane de ori mai puternică decât stricnina luată ca etalon, iar toxinele tetanică, neurotoxina de *Sh. dysenteriae* și cea botulinică de tip A sau B, de un milion de ori.

Efectul toxic este variabil nu numai în funcție de specia bacteriană, ci și de tulpina producătoare, chiar pe medii optime. În multe cazuri, toxigeneza se atenuează sau chiar dispare prin subcultivare repetată.

În general, efectul toxinelor este variabil în funcție de natura, vârsta, greutatea, sexul și linia genetică a animalelor pe care sunt testate, ca și de tehnica și calea de administrare folosite.

Datele referitoare la toxigeneză se referă la administrarea lor parenterală, deoarece cu excepția enterotoxinelor, toxinele uzuale sunt distruse de modificările de pH sau de activitatea enzimelor digestive.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Potențialul toxic al toxinelor este ilustrat de date teoretice:

1) toxina botulinică de tip A purificată și cristalizată ar conține într-un miligram, 1.000.000 DLM (doze limite mortale) pentru un kg corp cobai, ceea ce înseamnă că 1 mg de toxină poate să omoare 1 200 tone de cobai sau două milioane de șoareci;

2) 200 g neurotoxine (botulinică sau tetanică) ar putea omorî întreaga populație a globului.

Potențialul toxic al toxinelor bacteriene este dependent de calea de administrare. Dozele letale pentru căile respiratorie și digestivă sunt de 100–1000 de ori mai mari decât pentru căile intravenoasă, intramusculară, intraperitoneală sau subcutanată. Pielea intactă este o barieră eficientă față de toxine.

Toxicitatea diferitelor probe ale aceleiași toxine poate prezenta variații foarte importante: de exemplu, unele probe de toxină botulinică sunt de 6000 de ori mai toxice pentru cobai decât pentru șoarece, iar altele numai de 3 ori.

Exotoxinele au, uneori, un rol determinant în patogeneza unor agenți infecțioși, datorită potențialului lor toxic foarte înalt. De exemplu, toxinele purificate reproduc în general, manifestările clinice ale infecției cu *V. cholerae*, *C. tetani* sau *C. diphteriae*. Dar la majoritatea agenților patogeni, exotoxinele acționează sinergic cu alte componente celulare pentru a produce efectele potențiale asupra gazdei. Sinteza și secreția toxinelor este reglată de alți factori de virulență. De exemplu, capacitatea de aderență creează un contact strâns între agentul patogen și celula sensibilă, ceea ce permite transferul toxinei și exprimarea întregului potențial toxic. Deși toxina holerică poate reproduce multe din simptomele procesului infecțios, pentru exprimarea integrală a virulenței bacteriene este necesară *adezina* care leagă celula bacteriană de celula mucoasei intestinale. Alteori, toxina are alte funcții suplimentare celei de toxicitate, care amplifică virulența: toxina de *B. pertusis* are și rolul de proteină de aderență a bacteriei, la celulele mamaliene.

Receptori celulari pentru toxine

Interacțiunea toxinelor cu celulele sensibile, asemenea altor biomolecule (hormoni, antigene, lectine, fatori reglatori etc.) este mediată de molecule specifice denumite *receptori*, situate în stratul extern al membranei citoplasmatice. Celulele sensibile nu au receptori specifici pentru toxine. Toxinele împrumută receptorii, care în mod obișnuit au rolul de a îngloba molecule utile metabolismului celular.

Se cunosc receptorii prin intermediul cărora câteva toxine interacționează cu suprafața celulei. De exemplu, receptorul celular pentru streptolizina O (SLO), pentru listeriolizină (LLO) și pentru pneumolizină (PLO) este *colesterolul*. Aceste toxine se fixează pe suprafața celulei prin intermediul colesterolului membranar și nu depind de alți receptori de suprafață. De aceea, ele pot să lizeze membranele, teoretic, ale oricărei celule animale.

Toate toxinele acestui grup sunt alcătuite dintr-o singură catenă polipeptidică, a cărei lungime variază de la 471 aminoacizi (pentru pneumolizină) până la 571 pentru streptolizina O. Variația lungimii se datorează în întregime secvențelor localizate la capătul N-terminal, a căror funcție rămâne necunoscută. Cea mai lungă secvență, cu omologie aproape perfectă la toxinele grupului este de 11 aminoacizi și este bogată în triptofan.

Secvența comună pentru toate aceste molecule și esențială pentru activitatea citolitică, corespunde celei mai mici secvențe - a *pneumolizinei*. Pneumolizina se deosebește de celelalte toxine ale grupului, prin absența peptidului semnal secretor și din această cauză este eliberată numai prin liza celulelor de *Str. pneumoniae*.

Aceste toxine nu se leagă de membranele care nu conțin colesterol sau un compus înrudit cu colesterolul. Interacțiunea cu colesterolul se produce în absența altor lipide. Toxinele interacționează chiar cu sterolul pur în soluție sau în suspensie și rezultatul este inhibiția activității litice.

Alte câteva toxine au ca receptori moleculele de *gangliozide*. Acestea sunt *glicolipide*, mai abundente în neuroni, alcătuite dintr-o componentă oligozaharidică legată de un ceramid (acid stearic și sfingozină). Gangliozidele diferă între ele, prin numărul și secvența resturilor glucidice componente, în special a acidului N-acetil neuraminic (NANA) sau de acid sialic.

Toxina *tetanică* se leagă de gangliozide, în special de di- și tri-sialogangliozide, care conțin două și respectiv trei resturi de acid sialic, atașate de galactoză. Între toxina tetanică și hormonul tirostimulator (TSH) există o competiție de legare strict reciprocă, pe membrana celulelor tiroidiene.

Astfel s-a dedus că receptorul neuronal pentru toxina tetanică este asemănător cu receptorul celulei tiroidiene pentru TSH.

Receptorul celular pentru toxina *holerică*, ca şi pentru toxina termolabilă de *E. coli*, foarte asemănătoare toxinei holerice, este gangliozidul GM_1. S-a evidenţiat o corelaţie directă între conţinutul membranar în GM_1 şi sensibilitatea tisulară la toxină.

Receptorul celular al toxinei de *B. pertussis* pare a fi tot o gangliozidă care conţine acid sialic, iar receptorul toxinei difterice ar fi o glicoproteină.

În raport cu localizarea ţintei lor moleculare se disting două categorii de toxine:

- cele care au ţinta finală la nivelul *membranei*;
- toxine a căror ţintă finală este *citoplasmatică*.

Ţinta finală este structura a cărei interacţiune cu toxina produce efectul toxic, în timp ce receptorul are uneori rolul de ţintă intermediară, deşi alteori este chiar ţinta finală.

Toxinele care acţionează la nivelul *membranei* sunt active prin modificări structurale pe care le induc în membrana citoplasmatică, urmate de ruperea acesteia. Consecinţa este *citoliza* ori moartea celulei. Toxinele care consecutiv acţiunii lor produc dezorganizarea membranei se numesc *citolizine* (respectiv *hemolizine*, dacă celula ţinta este eritrocitul).

Toxinele a căror ţintă finală este intracelulară, traversează mai întâi membrana pentru a ajunge în citoplasmă.

Moleculele suprafeţei *eritrocitului*, cu rol de receptor pentru toxinele bacteriene, sunt *glicolipidele*. Legarea toxinelor de glicolipide pare a fi mai avantajoasă decât legarea de glicoproteine, pentru interacţia cu membrana, care este esenţială pentru acţiunea toxică.

Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă

Toxinele bacteriene a căror ţintă este intracelulară sunt molecule bifuncţionale, ca şi toxinele vegetale (ricina, abrina), bacteriocinele sau hormonii glicoproteici. Toate aceste categorii de molecule sunt alcătuite după acelaşi model funcţional, fiind monomere (de exemplu, toxina diftерică, exotoxina de *Ps. aeruginosa*) sau dimere (de exemplu, enterotoxina holerică şi cea termostabilă de *E. coli*). Cele monocatenare au o secvenţă COOH-terminală, prin care se leagă la nivelul receptorului şi o secvenţă NH_2-terminală, care pătrunde în citoplasmă şi interacţionează cu ţinta intracelulară. Pentru toxinele dublu catenare, funcţiile de legare *B* (*B*inding) şi de activitate propriu-zisă *A* (*A*ctivity) sunt realizate separat de fiecare catenă.

Pătrunderea moleculei de toxină în celulă este un proces complex pentru majoritatea toxinelor cu acţiune intracelulară şi se face prin unul din următoarele mecanisme:

- endocitoza mediată de receptori;
- pinocitoza nespecifică în faza lichidă;
- transferul direct al moleculei prin membrana citoplasmatică.

Înglobarea prin mecanismul endocitozei mediate de receptori conferă specificitate şi eficienţă acţiunii moleculelor mari. Receptorii celulari glicoproteici, după interacţiunea cu moleculele de toxină, suferă o dinamică accentuată. În mod normal, moleculele cu rol de receptor sunt uniform distribuite în planul membranei sau sunt concentrate în teritorii specializate denumite zone *tapetate cu clatrină** (*coated pits*), un înveliş de natură proteică pe faţa citoplasmatică a membranei. După legarea moleculei de toxină, complexele receptor-toxină se aglomerează în zonele tapetate cu clatrină, situate la baza microvilozităţilor. Zonele respective se intruzează şi formează *vezicule acoperite cu clatrină*, cu rol de transport. În citoplasmă, învelişul de clatrină se dezorganizează şi receptorii celulari deveniţi disponibili sunt reciclaţi spre suprafaţa celulei, iar molecula de toxină este eliberată spre un situs intracelular specific.

* *Clatrina* este o proteină mare, oligomerică, ce formează o reţea pe suprafaţa internă a membranei plasmatice, favorizând intruzia membranei şi formarea unei vezicule tapetată cu reţeaua moleculară, care ulterior poate fuziona cu alte organite celulare.

Mecanismele de acţiune a exotoxinelor

Efectul biologic al exotoxinelor este specific şi este datorat afinităţii lor caracteristice pentru anumite celule-ţintă ale organismului.

Unele toxine (tetanică, difterică, botulinică, holerică, eritrogenă) au un rol determinant în patogenitatea bacteriană. Primele patru enumerate mai sus, sunt factori unici ai patogenității pentru bacteriile producătoare. În cazul holerei, gravitatea infecției este consecința efectelor fiziopatologice nespecifice ale toxinei asupra mucoasei intestinale ce constau în pierderea apei și sărurilor minerale la acest nivel.

Eritemul specific scarlatinos, produs de *Str. pyogenes* se datorează efectului primar al toxinei eritrogene streptococice.

Enterotoxinele stafilococice și enterotoxina de *Cl. perfringens* produc efecte la nivelul mucoasei intestinale, ca rezultat al intoxicației alimentare.

Toxina produsă de *Sh. dysenteriae* este cauza dizenteriei, deoarece enterocitele și celulele endoteliale ale vaselor mici se lizează sub acțiunea toxinei, rezultatul fiind ulcerarea mucoasei intestinale.

Exotoxina de *B. anthracis* produce un edem local și hemoragie, iar în cazul septicemiei, efectul letal pare a fi datorat neurotropismului său, cu acțiune în special asupra centrului bulbar al respirației.

Efectele biologice ale toxinelor se produc la nivelul diferitelor structuri celulare. De exemplu, hemolizinele și leucocidinele acționează la nivelul membranei citoplasmatice, iar alte toxine sunt active asupra organitelor, asupra catenei transportoare de electroni ș.a.m.d.

Toxinele perturbă funcțiile celulei gazdă: influențează căile de transducere a semnalelor, rearanjează citoscheletul și traficul vacuolar.

Uneori, toxine cu structură asemănătoare pot genera manifestări clinice foarte diferite. De exemplu, toxina botulinică ingerată odată cu alimentele, produce o paralizie flască datorată acțiunii la nivelul terminațiilor nervoase periferice, iar toxina tetanică, eliberată în rănile profunde contaminate cu *C. tetani* produce paralizia spastică prin intermediul sistemului nervos central. Ambele toxine acționează prin același mecanism: blocarea eliberării mediatorilor sinaptici prin clivarea *sinaptobrevinelor*, proteine componente ale veziculei sinaptice. Toxina tetanică blochează eliberarea mediatorilor glicină și GABA, în timp ce toxina botulinică blochează eliberarea acetilcolinei. Ambele proteine sunt *metaloendoproteaze* și se aseamănă prin domeniile care leagă Zn.

În funcție de mecanismul de acțiune, exotoxinele se clasifică în: toxine cu conformație de tip AB, toxine formatoare de pori, toxine cu domeniul RTX, proteaze ale IgA, toxine termostabile, toxine care modifică citoscheletul gazdei (fig. 49).

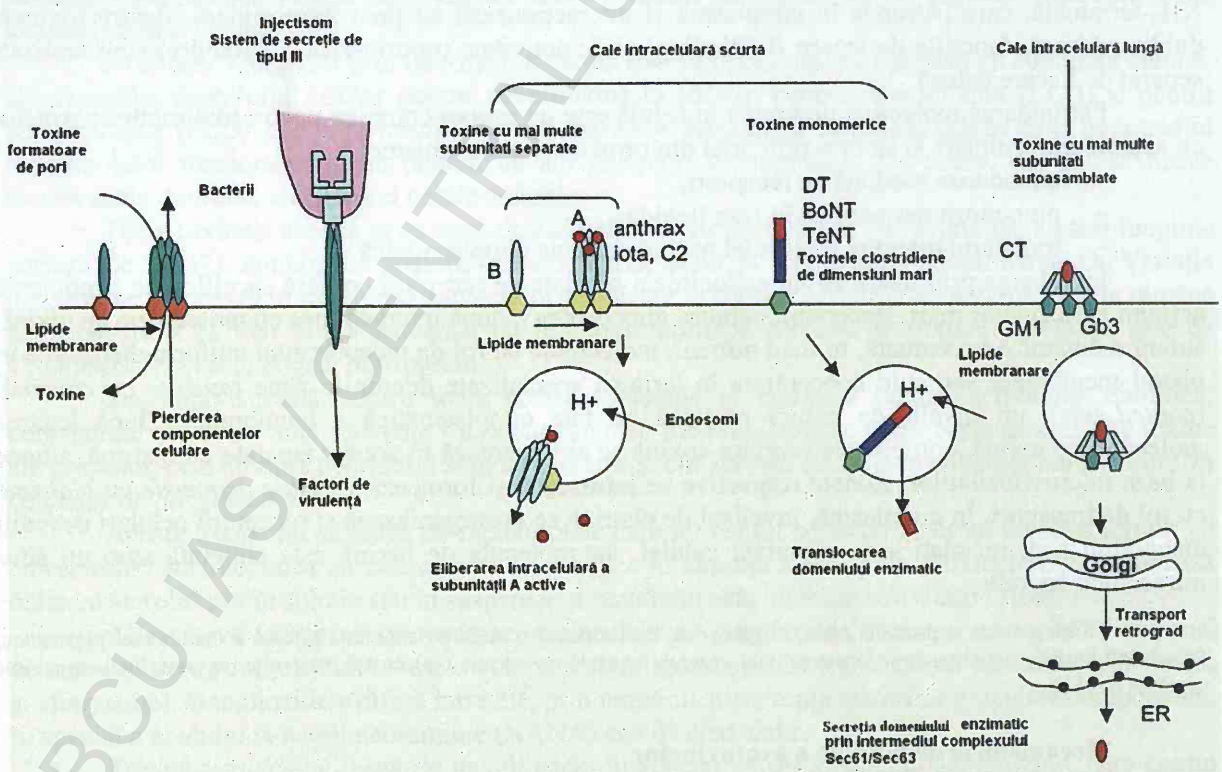


Fig. 49. Reprezentarea schematică a mecanismelor de acțiune ale diferitelor exotoxine de natură proteică (după Geny și Popoff, 2006).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Toxinele cu conformaţie de tip AB sunt alcătuite din 2 subunităţi:

– subunitatea A (*active*), determină activitatea enzimatică, toxică (activitate ADP-ribozilantă – toxina holerică, pertusică, activitate proteolitică – toxina tetanică, toxina botulinică) şi prezintă atât regiuni conservate, în special în regiunile importante pentru activitatea enzimei, cât şi regiuni variabile;

– subunitatea B (*binding*) care permite legarea de receptorii celulei gazdă şi facilitează eliberarea subunităţii active în interiorul celulei gazdă.

Cele două subunităţi pot fi localizate pe aceeaşi catenă polipeptidică (toxina difterică), pe două catene separate (toxina botulinică) sau pot avea formula AB5, cele 5 subunităţi B fiind asociate necovalent (toxina pertusică).

Activitatea enzimatică a subunităţii A produce efecte foarte variabile, de la cea ADP-ribozilantă (toxinele holerică, pertusică, diftrică, toxina termolabilă de *E. coli*, exotoxina A de la *Ps. aeruginosa* ADP-ribozil-transferazele – C_2 şi C_3 produse de *Cl. botulinum*), până la acţiunea *proteolitică* (toxinele tetanică şi botulinică).

O categorie aparte o formează următoarele toxine binare:

– toxina C_2 (produsă de *Cl. botulinum*);

– *CDT* (produsă de *Cl. difficile*);

– toxina *i* (iota produsă de *Cl. perfringens*);

– *CST* (produsă de *Cl. spiroforme*);

– toxinele edematoasă şi letală (*B. anthracis*);

– *VIP* (proteinele insecticide produse de celulele vegetative de *B. cereus*).

Subunităţile CDT, CST şi *i* au secvenţe ale aminoacizilor foarte asemănătoare şi sunt interşanjabile, ceea ce relevă o cale comună de evoluţie a acestor agenţi patogeni într-o nişă comună, asociaţi cu maladia gastrointestinală la om şi animale.

Spre deosebire de alte toxine binare, subunităţile acestor toxine nu se leagă de receptorii celulari sub forma complexului AB. Interacţiunea lor cu celulele implică legarea iniţială a componentelor B la receptorii celulari, ca monomeri, apoi formează homoheptameri pe suprafaţa sau în interiorul celulei. Monomerii B sunt generaţi numai după proteoliza precursorilor. Complexul heptamer B-receptor celular are rolul de suport pentru legarea componentei enzimatice A, după care este endocitat. În endosom, homoheptamerul se inseră în membrana veziculei, formând un por prin care componenta enzimatică A este translocată în citosol, unde produce efectul toxic prin unul dintre cele 3 mecanisme (fig. 50):

– mono-ADP-ribozilarea actinei G, ce determină dezorganizarea citoscheletului şi moartea celulei;

– proteoliza protein-kinazelor activate de mitogeni şi inhibarea semnalizării celulare;

– creşterea nivelului AMP ciclic, ce duce la edem şi imunosupresie.

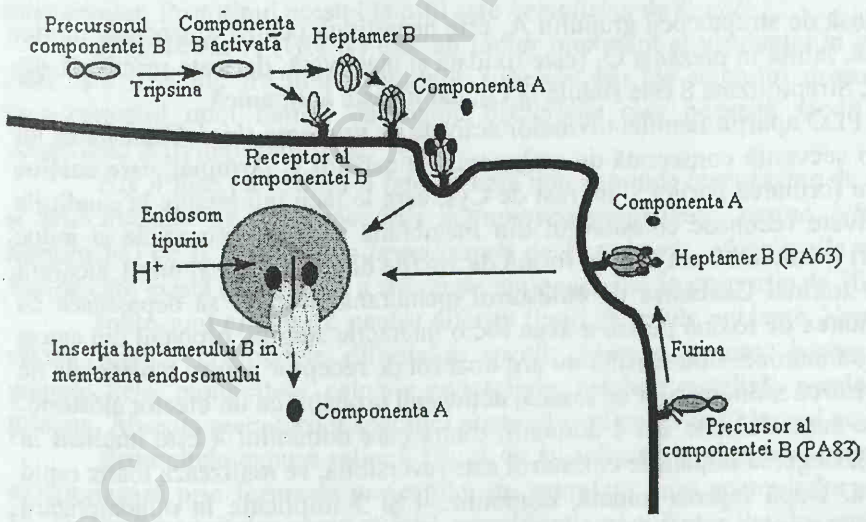


Fig. 50. Reprezentarea schematică a mecanismului toxic al toxinelor binare de *Clostridium sp.* şi *Bacillus sp.* Toxinele sunt formate din două subunităţi – A şi B – neasociate în soluţie sau pe suprafaţa celulei. Componenta B activată în mediul extracelular interacţionează cu receptorii celulari, fie ca homo-heptameri inelari preformaţi sau ca monomeri ce se asamblează ulterior heptameri. Componenta enzimatică A se leagă la heptamerul B legat de celulă şi complexul receptor holotoxină este înglobat pe calea EMR în endosomi ce se acidifică sub acţiunea ATP-azei din membrana vacuolară. Aciditatea endosomului este esenţială, deoarece heptamerul B se modifică conformaţional şi se inseră în membrană formând un canal prin care, probabil, componenta A este translocată în citosol. Excepţia o constituie precursorul antigenului protector (PA83) de la *B. anthracis*, deoarece se leagă de receptorul celular şi ulterior este clivat (după Barth şi colab. 2004).

Toxinele cu acțiune enzimatică (toxina Shiga, toxina holerică, toxina pertusică, toxina difterică și exotoxina A de *Ps. aeruginosa*) sunt clivate proteolitic pentru a produce fragmentul A catalitic activ.

Multe toxine neenzimatice care se inseră în membrana celulei eucariote, necesită clivajul proteolitic pentru a permite oligomerizarea și formarea porilor: hemolizina de *V. cholerae* El Tor este clivată N-terminal, iar aerolizina, toxina α de *C. septicum* și citotoxina de *Ps. aeruginosa* sunt clivate C-terminal. Hemolizina de *E. coli*, formatoare de pori, reprezintă o clasă unică de toxine ce necesită prelucrarea posttraducere pentru activare.

Toxinele formatoare de pori

Numeroase microorganisme patogene cu localizare intracelulară produc proteine care pot să lizeze membrana celulei eucariote. Câteva dintre aceste toxine sunt esențiale pentru patogenitate. Rolul lor este diferit, de la blocarea funcției celulelor imunitare, până la medierea ieșirii din vacuola de fagocitoză în citosol. Toxinele formatoare de pori acționează prin inserția toxinei în membrana plasmatică a celulelor gazdă, urmată de oligomerizarea monomerilor și formarea unor complexe parțial sau total circulare (por sau canal) care vor induce liza celulară (de exemplu, toxinele RTX produse de *E. coli*, *Bordetella sp.*, *Actinobacillus sp.*, *Proteus sp.*, *Pasteurella sp.*), toxinele α, β, γ, δ produse de *Staphylococcus sp.*, *Clostridium sp.*, toxinele tiol-activate produse de *Clostridium sp.*, *Listeria sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus sp.* Procesul de formare a porilor este independent de ATP. Rolul acestor toxine în patogeneză este puțin investigat, cu excepția listeriozinei care determină evadarea *Listeriei* din vacuola de fagocitoză.

Citolizinele (citotoxinele) sunt definite ca proteine care omoară celulele țintă. Ele pot acționa intracelular sau la nivelul membranei și formează *pori*. Efectul lor constă în liza eritrocitelor (hemolizine), leucocitelor (leucocidine) și celulelor tisulare. Citotoxinele cu acțiune intracelulară se leagă la nivelul receptorilor membranari și sunt prelucrate înainte de a ajunge în citoplasmă.

Mecanismele de acțiune ale citotoxinelor sunt diferite:

- inhibiția sintezei proteinelor celulare;
- inhibiția formării filamentelor de actină;
- formarea porilor membranari.

Formarea porilor în structura membranei țintă este un mecanism major de acțiune a citotoxinelor. Astfel de citotoxine se pot detecta prin activitatea lor litică asupra eritrocitelor, motiv pentru care se mai numesc hemolizine. Liza eritrocitelor poate fi un mecanism de dobândire a Fe.

Formarea porilor induce un set larg de reacții secundare în celulele nucleate: eliberarea citokinelor, disfuncția citoscheletului, sinteza mediatorilor lipidici. Liza leucocitelor poate determina scăderea reactivității imunitare.

Streptolizina O, produsă de streptococii grupului A, este hemolitică pentru eritrocitele multor specii de mamifere, antigenică, labilă în prezența O_2 (este oxidată și inactivată, dar este reactivată sub acțiunea agenților reducători). Streptolizina S este stabilă la O_2, dar nu este antigenică.

Toxinele SLO, LLO, PLO aparțin familiei toxinelor activate de gruparea *thiol*. Capacitatea lor de a *forma pori* depinde de o secvență conservată de aminoacizi la capătul C terminal, care conține resturi de Trp, esențiale pentru formarea porilor și un rest de Cys, care le face intolerante la condițiile oxidante. Toxinele *thiol* -activate recunosc colesterolul din membrana celulelor eucariote și induc formarea unor pori mari inelari (până la 30 nm) sau în formă de arc (de dimensiuni mai mici), alcătuiți din cca. 50 de monomeri de toxină. Cantitatea de colesterol membranar trebuie să depășească cu câteva ordine de mărime cantitatea de toxină pentru a avea loc o interacție stabilă, probabil din cauza unor restricții sterice sau termodinamice. Colesterolul nu are doar rol de receptor pentru moleculele de toxină, ci mediază și oligomerizarea monomerilor de toxină, acționând probabil ca un efector alosteric.

Toxinele thiol-activate sunt alcătuite din 4 domenii, dintre care domeniul 4 este implicat în legarea de receptor (colesterol). Legarea inițială de colesterol este reversibilă, se realizează foarte rapid și independent de temperatură. După legarea inițială, domeniile 1 și 3 implicate în oligomerizare suferă modificări alosterice care conduc inițial la apariția unui pre-por metastabil, care ulterior este stabilizat prin forțe de tensiune superficială. Porii incompleți, în formă de arc, permit de asemenea inserția moleculelor de toxină în membrană.

Rolul biologic major al acestor toxine este de a permite pătrunderea în interiorul celulei eucariote a altor toxine sau enzime bacteriene, prin porii de dimensiuni mari. În cazul bacteriilor intracelulare, aceste toxine (de exemplu, listeriolizina) permit propagarea infecției de la o celulă la alta.

Toxinele thiol-activate se găsesc la bacterii care au un mod de viață asemănător. *Listeria* și *Streptococcus* produc infecții invazive, iar toxinele lor sunt determinanți de patogenitate. Aceste bacterii produc enzime depolimerizante (proteaze, nucleaze) secretate concomitent cu toxinele. Porii formați de toxinele activate de thiol sunt mari și constituie calea de acces a acestor enzime în interiorul celulei. Toxina și enzimele cooperează pentru degradarea celulelor animale, în beneficiul agentului patogen.

În cazul infecțiilor clostridiene – gangrena gazoasă sau tetanosul, cele două moduri de viață prezintă convergențe evidente: toxinele pot fi implicate atât în stadiul inițial al lezării țesutului, necesar pentru realizarea unui mediu anaerob, cât și în stadiul tardiv (postmortem), caracterizat prin distrugere tisulară rapidă și masivă.

Listeriolizina este produsă intracelular și se abate de la condițiile de acțiune ale altor lizine, prin necesarul unui pH acid optim pentru acțiunea ei. Mediul acid este creat în fagosom, din care *Listeria* se eliberează prin secreția toxinei.

Unele toxine funcționează prin *inserția în membrana* celulei sensibile, formând un por sau canal, care duce la liza celulei prin mecanisme osmotice. O astfel de familie este formată de *toxinele RTX* (repeats in toxins – denumire datorată repetării unei secvențe de 9 aminoacizi în fiecare toxină), produse de bacteriile Gram-negative.

Toxinele RTX prezintă omologie de secvență și organizare genetică, precum și căi de secreție și activare similare:

- nu au secvență peptidică semnal și nu sunt clivate proteolitic în vederea maturării;
- regiunea COOH-terminală este implicată în secreția toxinei, pe calea sistemului de secreție de tip I;
- necesită un aparat secretor constituit dintr-un complex transmembranar format din mai multe proteine;
- sunt secretate fără acumularea intermediarilor periplasmici;
- prezintă unui reziduu de 9 aminoacizi, bogat în Gly, care leagă ionii de Ca^{2+}, repetat de mai multe ori în partea C-terminală. Când leagă Ca^{2+}, secvențele repetitive RTX formează scurte lanțuri β-pliate, organizate într-o structură neobișnuită de suprahelice-β. Legarea Ca^{2+} este o necesitate absolută pentru o activitate citotoxică și se produce după exportul proteinei. Nivelul intracelular al Ca^{2+} este prea mic (0,1 μM) pentru a activa Hly A.

Toxinele au fost grupate pe baza efectelor toxice și litice asupra celulelor gazdă ale mamiferelor. Prototipul acestei familii este *hemolizina* de *E. coli*.

Hemolizina A (Hly A) este un factor important al virulenței în infecțiile extraintestinale, așa cum sunt cele ale tractului respirator superior sau ale tractului urinar, produse de *E. coli*. Este reprezentantul unei familii de toxine bacteriene care necesită modificarea posttraducere pentru dobândirea activității biologice.

Hly A face parte dintr-o familie care mai cuprinde *leucotoxina* de *Y. haemolytica*, *hemolizinele* și *leucotoxinele* de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *toxina bifuncțională* (adenilat-ciclază/ hemolizină) de *B. pertussis* și *hemolizinele* de *P. vulgaris*, *Morganella morganii* și *Moraxella bovis*, față de care există o identitate a secvenței aminoacizilor în proporție de 30-75%.

Toate sunt citotoxice pentru diferite tipuri de celule nucleate. Hemolizina de *E. coli* lizează în câteva minute eritrocitele diferitelor specii: șoarece, iepure, berbec, bovine, cal, om, dar și granulocitele, monocitele, celulele endoteliale, celulele epiteliale renale de șoarece, rumegătoare și primate. Absența receptorilor specifici poate să explice spectrul larg al acțiunii Hly A.

Eritrocitele expuse acțiunii Hly A de *E. coli* suferă schimbări majore ale citoscheletului care se exteriorizează prin formarea proiecțiilor de suprafață. Liza eritrocitelor poate să semnifice eliberarea Fe, iar liza leucocitelor poate să aibă semnificația unui factor de virulență, care împiedică fagocitoza. Majoritatea bacililor Gram-negativi, inclusiv unele specii din microbiota normală gastrointestinală produc hemolizine:

Unele citolizine sunt fosfolipaze: *LLO* de *L. monocytogenes*, citolizinele produse de *Cl. perfringens* şi *Ps. aeruginosa* sunt fosfolipaze C, iar cea de *Corynebacterium pseudotuberculosis* este o fosfolipază D.

Fosfolipazele bacteriene cuprind un grup heterogen de proteine-enzime, care produc o varietate de efecte *in vivo* şi *in vitro*, de la alterări celulare minore în structura şi funcţia membranei citoplasmatice, până la efectul letal.

Listeriolizina O (LLO) produsă de *L. monocytogenes*, este singura toxină activată de gruparea tiol, a cărei activitate optimă este la pH acid din vacuola intracelulară, declanşând liza vacuolei.

LLO este singura toxină-enzimă din familia citolizinelor produsă de un patogen intracelular, care are rolul de a liza fagosomul. Acidifierea conţinutului vacuolar declanşează efectul litic al LLO, limitat la membrana fagosomului.

LLO este reprezentată de două *fosfolipaze C*, cu specificitate pentru fosfatidil-inozitol şi fosfatidil-colină.

Ieşirea agenţilor patogeni de *Rickettsia* din vacuola celulei este mediată de *fosfolipaze*, care fac parte din aceiaşi familie a citolizinelor.

Trypanosma cruzi invadează celulele, cu formarea vacuolelor acide intracelulare şi produce o toxină activă la pH 5,5, în stadiile intracelulare ale ciclului. Blocarea acidifierii reduce capacitatea *T. cruzi* de a liza vacuola şi de a trece în citosol.

Toxinele *termostabile* produse de *E. coli, Yersinia* sp., *Citrobacter freundii, Vibrio mimicus* acţionează printr-un mecanism comun: *activarea guanilat-ciclazei*.

Enterotoxinele sunt proteine secretate care se leagă de un receptor celular, intră în celulă şi produc creşterea nivelului AMPc.

O mare parte dintre enterotoxinele diareice se leagă la receptorii de natură glicosfingolipidică. Unele dintre aceste toxine sunt capabile să formeze canale permeabile pentru ionii de Ca, care pătrund în celulele epiteliului intestinal şi acţionează ca mesager secundar, modulând procesele de transport ionic. Toxinele care nu formează astfel de canale, determină, consecutiv, interacţiunii cu receptorii specifici, eliberarea altor mesageri secundari inductori ai secreţiei ionilor de Cl^-, care la rândul lor antrenează secreţia ionilor de Na^+ şi a apei, ca şi a altor anioni, ceea ce conduce la acumularea apei în lumenul inestinal, la dezechilibrarea balanţei hidro-electrolitice şi generarea diareii secretorii. Activitatea enterotoxinelor se poate evidenţia *in vitro* prin alungirea celulelor CHO (*Chinese hamster ovary*), rotunjirea celulelor Y-1 (*mouse adrenal tumor cells*) sau prin determinarea AMPc în celulele expuse acţiunii toxinei. O metodă independentă de celulele cultivate este ELISA (*enzyme-linked imunosorbent assay*). Receptorii specifici (de exemplu, gangliozidele GM_1) sunt fixate pe faza solidă pentru a lega enterotoxina, care poate fi detectată cu antiserul specific. În varianta alternativă a metodei ELISA, *sandwich*, faza solidă constă din fragmente F(ab')2 ale anticorpilor anti-toxină. Ambele metode au sensibilitate şi specificitate înalte. *In vivo*, pentru detectarea activităţii enterotoxinelor se foloseşte testul ansei ileale de iepure sau de şobolan.

Toxine cu activitate ADP-ribozilantă

Toxinele ADP-ribozilante au ca situs comun de legare NAD. Efectul lor constă în *transferul ADP-ribozei* de la NAD, pe care o leagă covalent, la proteine ale celulei eucariote, după reacţia globală:

$$NAD^+ + \text{Proteina ţintă} \text{ ----- } \text{ADP-riboza- Proteină} + \text{Nicotinamida} + H^+.$$

Unele dintre exotoxinele grupului se asociază cu proteine cu rol important în fiziologia celulară, care au capacitatea de a lega nucleotidele şi produc ADP-ribozilarea:

- unor proteine heterotrimerice care leagă GTP;
- unor proteine mici care leagă GTP;
- actinei;
- altor proteine ale celulei eucariote, neidentificate.

Exotoxinele ADP-ribozilante au trei tipuri de organizare A-B:

- proteine polipeptidice unice, cu componentele A-B legate covalent;

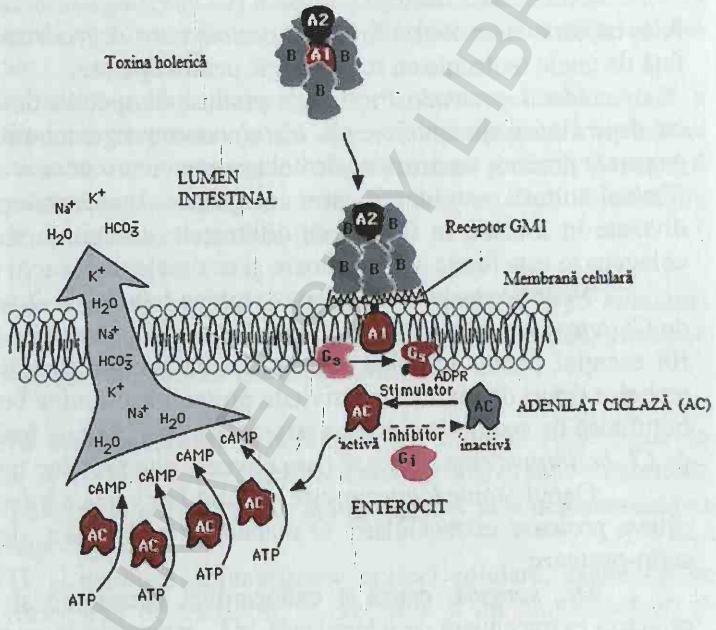
– complexe cu componente A-B localizate pe proteine separate, legate prin interacțiuni necovalente;
– complexe multiproteice cu componente A-B localizate pe două proteine separate.

Pentru unele exotoxine ADP-ribozilante, nu s-a evidențiat organizarea structurală de tip A-B.

Mecanismele activării exotoxinelor ADP-ribozilante, *in vitro,* cu organizare de tip A-B (fig. 51, 52) sunt:

– proteoliza parțială și generarea peptidului A activ cu activitate catalitică;
– reducerea legăturilor S-S;
– activarea alosterică de către nucleotide sau de către proteinele accesorii ale celulei eucariote.

Fig. 51. Mecanismul de acțiune al toxinei holerice.



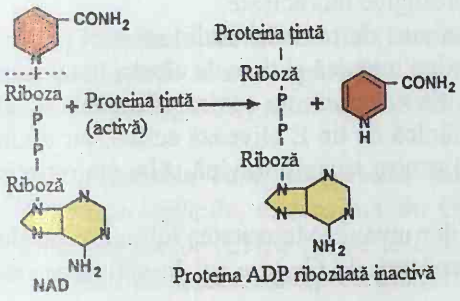


Fig. 52. Reprezentarea reacției de ADP-ribozilare.

Modelul de acțiune* a toxinelor ADP-ribozilante s-a elaborat pe baza proprietăților moleculare ale *toxinei difterice*, *exotoxinei A* de *Ps. aeruginosa* și *enterotoxinei* termolabile de *E. coli.*

* Reacțiile de ADP-ribozilare sunt de 4 tipuri: mono-ADP-ribozilare, poli-ADP-ribozilare, reacții de ciclizare a ADP-ribozei și reacții cu formarea O-acetil-ADP-ribozei. În aceste reacții NAD^+ are rolul de donor al ADP-ribozei, ceea ce impune sinteza sa constantă pentru a evita epuizarea rezervei celulare. NAD^+ se sintetizează din L-Trp și acid nicotinic, din nicotinamidă. Mono-ADP-ribozilarea este o reacție filogenetică veche, reversibilă, de modificare post-traducere, prin legarea covalentă a ADP-ribozei eliberată de NAD^+, de un aminoacid specific al unei proteine acceptoare, cu eliberarea simultană a nicotinamidei. În celulele eucariote, reacția are loc prin mecanism enzimatic sau neenzimatic, fiind identificată inițial ca mecanism patogen al câtorva toxine bacteriene: pertusică, holerică, unele toxine clostridiene, catalizate de mono-ADP-ribozil-transferaza (MART). Enzima s-a detectat la multe procariote, eucariote și la virusuri.

Reacția de ADP-ribozilare catalizată de MART este reversată de mono-ADP-ribozo-hidrolaze (MARH), prin hidroliza legăturii covalente dintre proteină și ADP-riboză. Coexistența în aceiași celulă a ADP-ribozil-transferazelor și a hidrolazelor sugerează că mono-ADP-ribozilarea proteinelor are rolul unui mecanism reglator reversibil. Cele mai studiate reacții de mono-ADP-ribozilare sunt catalizate de toxinele bacteriene. S-au identificat cel puțin 6 clase de MART cu specificitate de aminoacid: pentru Arg, Asp, Glu, Cis, His modificată etc. În celula eucariotă sunt ADP-ribozilate proteine extracelulare, citoplasmatice și nucleare (Hassa et al., 2006).

Toxina difterică și exotoxina A de *Ps. aeruginosa* produc ADP-ribozilarea proteinelor mari care leagă GTP, cum ar fi factorul de alungire a catenei polipeptidice EF-2, la resturi de acid glutamic diferite (148 și respectiv 553), dar omologe din punct de vedere funcțional, deoarece ambele leagă inelul nicotinamidei din NAD printr-un mecanism dependent de UV.

Toxinele proteolitice

Proteazele sunt enzime care catalizează hidroliza legăturilor peptidice ale proteinelor. Ele sunt fie exopeptidaze, a căror acțiune este limitată la capetele –COOH sau $-NH_2$ ale proteinelor, sau

endopeptidaze – cele care clivează legăturile peptidice interne. Proteazele sunt sintetizate de toate organismele şi îndeplinesc funcţii variate.

Proteazele microbiene sunt predominant extracelulare şi pot fi clasificate în 4 grupe, în funcţie de restul catalitic esenţial la situsul activ: *serin-proteaze, cistein-proteaze* (tiol-proteaze), *aspartat-proteaze* şi *metaloproteaze*. Cele mai multe metaloproteaze sunt proteinele cu Zn. Zn este un component integral al multor proteine implicate în toate aspectele metabolismului.

La toate enzimele cu Zn, a căror structură cristalină este cunoscută, un atom de Zn catalitic are raporturi egale cu 3 resturi de aminoacizi ai proteinelor şi o moleculă activă de apă, iar atomii structurali de Zn au raporturi egale cu 4 resturi de cisteină.

Numeroase bacterii patogene (*Cl. perfringens, S. aureus, N. gonorrhoeae*, streptococii de grup A şi bacterii anaerobe) eliberează *enzime care degradează* ţesuturile gazdei sau au acţiune specifică faţă de unele molecule cu rol strategic pentru apărare.

Metaloproteaze. Proteazele produse de speciile de *Clostridium* s-au asociat cu patogenitatea şi cu deprecierea alimentelor. *Cl. histolyticum* – agentul cauzal al mionecrozei clostridiene (gangrena gazoasă) produce un amestec de colagenaze cunoscut ca o clostridio-peptidază A sau colagenază A. În filtratul culturii s-au identificat 6 colagenaze: sunt metaloproteaze cu Zn dependente de Ca, ce pot fi divizate în 2 clase, în funcţie de diferenţele structurale şi biochimice. Structura secundară a celor 6 colagenaze este foarte asemănătoare şi enzimele dau reacţii serologice încrucişate.

Neurotoxinele clostridiene – toxina tetanică şi 7 serotipuri de toxină botulinică sunt produse de *Cl. tetanicum* şi respectiv *Cl. botulinum*. Zn se leagă de toxina tetanică şi de cele clostridiene şi are rol esenţial pentru inhibiţia eliberării mediatorilor sinaptici de către aceste toxine. Catenele L ale ambelor tipuri de toxine au activitate proteolitică: toxina botulinică de tip E clivează actina, iar toxina botulinică de serotip B şi toxina tetanică au specificitate înaltă pentru sinaptobrevină. Alte neurotoxine de *Cl. botulinum* sunt proteaze care clivează alte proteine ţintă.

Genul *Staphylococcus* este o cauză frecventă a infecţiilor umane. Majoritatea tulpinilor produc câteva proteaze extracelulare. O metaloprotează cu Zn, dependentă de Ca, are rol în activarea unei serin-proteaze.

Str. sanguis, cauză a endocarditei bacteriene şi constituent al plăcii dentare, produce o protează extracelulară ce degradează IgA, caracterizată ca o metaloprotează. Enzima s-a identificat în leziunile parodontale produse de streptococi.

Proteaza care clivează IgA$_1$ este un factor major al virulenţei pentru *N. gonorrhoeae, N. meningitidis, H. influenzae, Str. pneumoniae, H. pylori, Serratia marcescens, EPEC, Sh. flexneri,*

La *V. cholerae*, enzima clivează IgA$_1$ la secvenţe specifice prolină-treonină sau prolină-serină în regiunea „balama" şi inactivează acţiunea specifică a anticorpului principal, protector al mucoaselor. IgA proteazele sunt sintetizate sub formă de precursori inactivi, care înainte de a fi secretaţi suferă un proces de autoproteoliză. Secreţia se realizează fără acumulare de intermediari în spaţiul periplasmic. Pentru translocaţia prin membrana externă, nu necesită prezenţa factorilor accesorii (sunt autotransportatori).

Pronaza P, un amestec comercial de proteaze produse de *Streptomyces griseus*, conţine câteva tipuri de proteaze, inclusiv câteva metaloproteaze neutre. Din pronaza P s-au purificat şi caracterizat 2 endopeptidaze cu Zn.

Ps. aeruginosa, un patogen oportunist ce produce infecţii fatale în special la persoanele imunosupresate, secretă numeroase produse extracelulare, două dintre ele fiind metaloproteaze: elastaza şi o protează alcalină. Elastaza este o metaloprotează cu Zn, ce degradează o varietate de proteine: elastina, laminina, fibrina, colagenul uman, câteva componente ale C şi Ig.

Legionella, un patogen facultativ, ce produce o pneumonie acută (boala legionarilor) secretă o metaloprotează neutră cu Zn. Enzima are multe proprietăţi care sugerează implicarea în patogeneză: este citotoxică şi este distructivă pentru ţesuturi.

Hemaglutinina de *V. cholerae* O1 este o protează neutră cu Zn, dependentă de Ca, care clivează câteva substraturi: mucina, fibronectina, lactoferina.

Aeromonas hydrophila, un patogen oportunist pentru om şi peşti, produce o varietate de substanţe extracelulare, inclusiv proteaze, ce condiţionează virulenţa. Metaloproteaza de *A. hydrophila* are activitate esterazică, dar nu citotoxică.

S. marcescens este un patogen oportunist. Secretă o metaloprotează, ca factor de virulenţă în infecţiile pulmonare. Enzima degradează fibronectina, colagenul şi câteva proteine serice.

Multe proteaze bacteriene extracelulare sunt sintetizate ca precursori cu un peptid suplimentar (propeptid), care este clivat şi nu se regăseşte în proteina matură secretată. Propeptidul are rolul de a menţine proteaza în stare inactivă în interiorul celulei, protejând celula de efectul proteazei. Poate avea rol în plierea proenzimei într-o conformaţie necesară pentru activitate sau pentru secreţie; poate ancora proteaza de membrană.

Mecanismul clivajului nu este cunoscut: s-a sugerat o prelucrare autoproteolitică.

Alte enzime degradative. C. perfringens produce *lecitinaza* care atacă lecitina (fosfatidil-colina), lipidul membranar major şi este hemolitică. *S. aureus* secretă *coagulaza*, care în asociaţie cu factorii sanguini produce coagularea plasmei şi formează o reţea de fibrină pe suprafaţa celulei bacteriene, cu efect protector faţă de fagocite.

Hialuronidazele, enzime ce hidrolizează acidul hialuronic din substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv sunt produse de stafilococi, streptococi şi de anaerobi. Streptococii hemolitici produc streptokinaza (fibrinolizina), ce activează o enzimă proteolitică a plasmei şi dizolvă coagulul plasmatic, favorizând diseminarea streptococilor în ţesuturi. Streptokinaza a fost folosită în tratamentul infarctului miocardic acut, pentru a dizolva cheagul de fibrină.

Toxinele termostabile (secretate de *Yersinia pestis*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio mimicus*) sunt polipeptide scurte bogate în Cys, care activează calea guanilat-ciclazei a celulei gazdă, deoarece prezintă omologie cu guanilina, activator endogen al guanilat-ciclazei intestinale.

Toxinele care acţionează asupra citoscheletului celulei gazdă (toxinele A şi B de la *Clostridium difficile*, exoenzima de C_3 de la *C. botulinum*, factorii citoxici necrozanţi – *cytotoxic necrotizing factor* (CNF) 1,2 de la *E. coli*) alterează polimerizarea actinei gazdei prin acţiunea asupra proteinelor Rho, Ras, Rac (proteine care leagă GTP).

Proteinele familiei Rho leagă GTP şi mediază polimerizarea *actinei* celulare, având rol în organizarea citoscheletului, în formarea veziculelor de transport, în creşterea şi diviziunea celulei şi desfăşurarea ciclului celular, participă la procesele de transducţie a semnalelor, sunt implicate în endocitoza mediată de receptor şi secreţie, controlează transcrierea, apoptoza şi transformarea celulară şi sunt *ţinta acţiunii toxinelor* bacteriene.

Proteinele Rho sunt GTP-aze mici, controlate prin ciclul GTP-azei: sunt inactive în forma legată de GDP, dar se activează după trecerea GDP în GTP. Invers, hidroliza GTP legat, inactivează proteinele.

Exoenzimele şi moleculele înrudite

Pe lângă exotoxine, celulele bacteriene produc o serie de exoenzime implicate în liza celulară, denaturarea moleculelor care formează joncţiunile intercelulare, formarea şi dizolvarea cheagurilor sanguine: leucocidine (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp.) implicate în alterarea fagocitozei, hemolizine (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *C. perfringens*) care produc liza eritrocitară, coagulaze (*Staphylococcus* sp.) – implicate în coagularea fibrinogenului plasmatic, kinaze (*Str. pyogenes* – streptokinază, *S. aureus* – stafilokinază) ce produc denaturarea şi dizolvarea cheagului de fibrină, hialuronidaza implicată în hidroliza acidului hialuronic (*Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp.), colagenaza implicată în denaturarea colagenului, factori necrozanţi, hipotermici, lecitinaze, proteaze, siderofori.

Endotoxinele (LPS) sunt relativ termostabile şi mai puţin toxice decât exotoxinele, iar efectele lor sunt lipsite de specificitate. Din punct de vedere chimic, endotoxinele LPS sunt macromolecule complexe ce conţin fosfolipide şi polizaharide, toxicitatea lor este indirectă, iar activitatea biologică se manifestă la concentraţii mari.

Termenii de "LPS" şi "endotoxină" sunt folosiţi cu sensuri echivalente, dar LPS semnifică moleculele purificate, iar denumirea de "endotoxină" desemnează complexul format din LPS şi proteinele asociate din membrana externă.

LPS sunt molecule amfifile, cu o parte *hidrofobă*, capabilă să se dizolve în lipidele membranare şi o regiune *hidrofilă*, care poate rămâne în faza apoasă. O primă treaptă a acţiunii LPS o constituie interacţiunea dintre molecula amfifilă şi suprafaţa celulei sensibile. Molecula LPS poate fi inserată în membrana celulei prin jumătatea hidrofobă sau se ataşează de receptorii membranari prin jumătatea hidrofilă. O modalitate distinctă a interacţiunii LPS cu macrofagele, este aceea mediată de o proteină plasmatică de fază acută denumită LBP (*LPS binding protein*).

Sursele majore de endotoxine sunt următoarele: 1) septicemia cu bacterii Gram negative; 2) bacterii originare în microbiota intestinală, datorită leziunilor mucoasei.

O particularitate a LPS, în contrast cu acţiunea exotoxinelor, constă în aceea că simptomele toxice nu se datorează acţiunii lor directe asupra celulelor sensibile, ci sunt mediate, în mare parte, de citokinele sintetizate *de novo* de macrofage, ca răspuns la LPS.

LPS sunt molecule foarte *imunogene* prin stimularea nespecifică, policlonală a limfocitelor B. Anticorpii au specificitate faţă de polizaharidul extern şi precipită LPS, dar nu neutralizează efectele lor toxice. Răspunsul imun este de tip primar, deoarece molecula de LPS este un antigen timo-independent, cu grupări antigenice repetitive.

Lipidul A are proprietăţi imunogene, iar anticorpii specifici reacţionează încrucişat cu lipidul A al altor endotoxine, datorită uniformităţii structurii sale.

Antigenul polizaharidic, obţinut prin hidroliza acidă îşi păstrează proprietatea de specificitate, dar nu este imunogen, având proprietatea de haptenă.

Efectele endotoxinei se manifestă atât în stare fizică legată de celulă, cât şi după ce a fost eliberată prin moartea şi liza celulei sau printr-un proces de "înmugurire", care nu influenţează viabilitatea acesteia. Din această cauză, cele două stări, *endotoxemia* şi *bacteriemia* pot să coexiste sau să se manifeste în etape distincte ale procesului infecţios. Proprietăţile endotoxice ale celulelor bacteriene, vii sau omorâte, sunt aceleaşi cu ale preparatului de endotoxină. În organismul infectat nu există o corelaţie lineară între nivelul bacteriemiei şi al endotoxemiei şi respectiv, intensitatea efectelor endotoxice. Capacitatea organismului de a detoxifica este un factor modulator esenţial al manifestărilor endotoxice. Glucocorticoizii au efect protector anti-endotoxic, probabil prin modificarea permeabilităţii capilare.

Endotoxinele nu au rol în colonizarea şi penetrarea suprafeţei mucoase, deoarece lipidul A are o localizare profundă în membrana externă. Tulpinile invazive şi neinvazive de *Salmonella* produc cantităţi similare de endotoxină. Endotoxina are rol în iniţierea infecţiei, probabil prin inducerea unei scăderi tranzitorii a capacităţii de apărare a gazdei, prin întârzierea declanşării unui răspuns inflamator.

Dozele mici de toxină măresc rezistenţa organismului la infecţiile bacteriene şi virale prin stimularea activităţii fagocitare şi respectiv, a producerii de interferon.

Endotoxinele iniţiază calea alternativă a activării complementului, dar efectul nu este bacteriocitoliza, deoarece reacţia se produce la distanţă de membrana externă. *In vitro* au efect mitogenic asupra limfocitelor B. LPS au proprietăţi adjuvante, deoarece stimulează răspunsul imun specific faţă de un antigen administrat simultan.

Dozele mari de endotoxine determină o serie de manifestări patologice sistemice, nespecifice:

- *hipertermie* (febră), prin acţiunea lor asupra centrilor termoreglării, chiar după administrarea unor doze minimale. Inducerea febrei este semnul marcant al toxicităţii LPS. Febra este efectul indirect al acţiunii LPS asupra macrofagului, care secretă câteva citokine: IL-1, TNF β, IFN γ, cu acţiune directă asupra hipotalamusului. Starea febrilă se instalează brusc, este monofazică, mediată de prostaglandine;
- *leucopenie* urmată de leucocitoză. Efectul se exercită direct şi rapid asupra leucocitelor. Ele părăsesc patul vascular şi se retrag aproape instantaneu în plămân şi în alte ţesuturi, în proporţie de circa 60%. Dupa circa 4 ore, numărul leucocitelor circulante creşte peste limitele normale. Creşte numărul hematiilor circulante, datorită eliberării în circulaţie a rezervelor celulare din centrele de formare şi depozitare a eritrocitelor;
- *modificări cardiovasculare*: legarea endotoxinei de celulele hepatice sau de alte celule induce eliberarea rapidă a aminelor biogene (histamina, serotonina) şi a peptidelor (bradikinina) din depozitele celulare. Aminele produc o hipertensiune tranzitorie, urmată

de hipotensiune severă, hipovolemie şi formarea cheagurilor vasculare de fibrină. Endotoxinele activează sistemul de coagulare sanguină;

– *efecte metabolice*: endotoxina inhibă sistemele enzimatice ale gluconeogenezei şi ale sintezei glicogenului.

Din punct de vedere clinic, dozele mari de endotoxină produc următoarea secvenţă de modificări: frison, febră, somnolenţă, dispnee, modificări ale dinamicii tranzitului intestinal, diaree sanguinolentă, hiperglicemie incipientă urmată de hipoglicemie, paralizie, comă, moarte. Acest tablou de modificări se succede în circa 24 de ore după injectarea preparatului la animalele sănătoase şi corespund stării de *şoc endotoxic*, consecinţă a endotoxemiei (fig. 53). Endotoxemia este rezultatul supraîncărcării celulelor cu rol de apărare, ca urmare a revărsării endotoxinelor în circulaţie. Starea de endotoxemie nu este totdeauna urmată de şoc şi moarte. Nu se cunosc cauzele marilor diferenţe de răspuns şi reactivitate, la starea de endotoxemie. Şocul fatal este consecinţa interacţiunii endotoxinei cu sistemul de coagulare a sângelui, pe care îl activează şi îl amplifică. S-a emis ipoteza că instalarea şocului ireversibil este favorizată de absorbţia în sânge a endotoxinelor produse de microbiota intestinală. În mod normal, mecanismele de detoxifiere a organismului sunt eficiente, dar starea de şoc se instalează consecutiv diverselor tulburări funcţionale, care împiedică o reactivitate optimă faţă de infecţia cu bacterii Gram negative.

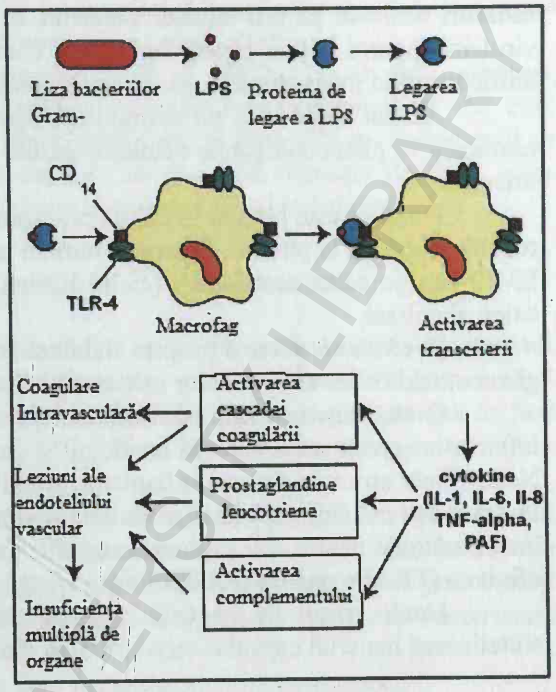


Fig. 53. Efectele patologice ale endotoxinelor (după Kaiser, 2005)

Şocul este consecinţa unui *răspuns inflamator* intens la produsele de origine microbiană. Inflamaţia este reacţia de mobilizare a componentelor humorale (anticorpi, complement) şi celulare (neutrofile, macrofage, limfocite T) ale sistemului imunitar. Celulele activate, dar în special celulele seriei monocit/macrofag iniţiază sinteza unei cantităţi mari de mediatori specializaţi: citokine, chemokine, mediatori lipidici. Mediatorii alterează permeabilitatea vasculară şi fluxul sanguin. Creşte aderenţa fagocitelor la celulele endoteliale şi se intensifică migrarea leucocitelor în ţesut. De cele mai multe ori, procesul inflamator are ca rezultat eliminarea agentului infecţios, sterilizarea focarului şi regenerarea tisulară. Răspunsul biologic net inflamaţiei este determinat de raportul mediatorilor proinflamatorii şi anti-inflamatorii. Şocul este consecinţa unui dezechilibru major în favoarea mediatorilor proinflamatorii. TNF şi IL-1 sunt consideraţi a fi cei mai importanţi mediatori ai răspunsului inflamator. *In vivo*, acţiunea lor este sinergică, într-o infecţie locală sau sistemică. Blocarea ambelor citokine cu anticorpi specifici diminuă mult severitatea inflamaţiei.

Porphyromonas gingivalis, H. pylori şi *Chl. trachomatis*, asociate cu maladii inflamatorii cronice, conţin LPS cu activitate biologică scăzută, adică stimulează puţin sinteza de mediatori ai inflamaţiei. Aceste LPS au mai puţini acizi graşi şi grupări fosfat ataşate de lipidul A.

Starea de şoc este indusă de bacteriemia cu bacterii Gram negative şi se datorează eliberării masive a endotoxinei, spontană sau consecutivă lizei bacteriene. Unii pacienţi trataţi cu antibiotice eficiente pot sucomba datorită şocului produs de eliberarea masivă a endotoxinelor din bacteriile omorâte. Antibioticele β-lactamice sunt cele mai eficiente pentru eliberarea endotoxinei în exces. Capacitatea lor de a elibera endotoxina este dependentă de afinitatea de legare la diferite proteine ale membranei externe.

Capacitatea de a elabora toxine nu este limitată la bacteriile patogene propriu-zise. Numeroase saprobacterii produc substanţe toxice, uneori foarte puternice (de exemplu, toxina botulinică produsă de *Cl. botulinum*). Toxigenitatea bacteriană variază la diferitele tulpini ale aceleiaşi specii şi este dependentă de condiţiile de mediu.

4.6. Proprietăţi metabolice particulare implicate în virulenţa bacteriană

Multe bacterii patogene şi comensale folosesc acizii sialici ca surse de C, N, energie şi de zaharuri aminate pentru sinteza peretelui celular. Metabolizarea acidului sialic este un factor de virulenţă pentru câţiva agenţi infecţioşi. Cunoaşterea mecanismelor metabolismului acidului sialic unifică studiul interacţiunilor gazdă-agenţi patogeni ai unor maladii infecţioase invazive.

Acidul sialic este un component ubiquitar al glicoproteinelor vertebratelor şi are o poziţie terminală în glicoconjugatele celulelor gazdă, fiind molecula care mediază interacţiunea celulă-agent infecţios.

După ce este preluat în celulă prin transportori de mare afinitate, acidul sialic poate fi clivat şi rezultă ManNAc şi piruvat. Piruvatul intră în metabolismul intermediar ca fosfo-enol-piruvat (pe calea EMP) sau pe calea acetil-CoA (ciclul Krebs), iar ManNAc este convertit la fructozo-6P şi intră în calea glicolizei.

V. cholerae secretă propria sialidază (neuraminidază) – o glicohidrolază ce clivează legăturile glicocetozidice ale enterocitelor prin reacţie exohidrolitică, eliberând acidul sialic pentru catabolism.

O altă funcţie a sialidazei microbiene este modularea imunităţii înnăscute a gazdei. În focarul inflamator creşte concentraţia acidului sialic, pe o cale independentă de sialidaza microbiană. Neutrofilele atrase în focarul inflamator, stimulate de IL-8, mobilizează sialidaza intracelulară proprie la suprafaţa celulei, eliberând acidul sialic din moleculele proprii şi din glicoproteinele moleculelor înconjurătoare pentru a fi preluat de agenţii infecţioşi care posedă mecanisme transportoare de înaltă afinitate (TRAP= *tripartite ATP-independent periplasmic transporters*).

Unele specii de bacterii patogene sintetizează acidul sialic: *E. coli* K_1, *N. meningitidis* sintetizează material capsular cu o structură chimică identică: poli-acid sialic.

4.7. Reglarea expresiei factorilor de virulenţă

La bacterii au fost descrise o serie de mecanisme implicate în reglarea şi coordonarea expresiei factorilor de virulenţă şi patogenitate:

- *sistemele de reglare cu 2 componente* (*quorum sensing and response*) cu o distribuţie ubiquitară în lumea bacteriană (*Erwinia carotovora, E. chrysanthemi, E. stewartii, E. herbicola, Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens, Ps. syringae, Ps. solanaceum, Ps. aureofaciens, Chromobacter violaceum, Rhizobium meliloti, R. leguminosarum bv. phaseoli, R. leguminosarum bv. viciae, Photobacterium (Vibrio) fischeri, Aeromonas hydrophila, Vibrio anguillarum, V. harveyi, V. cholerae, Serratia liquefaciens, S. marcescens, Y. Enterocolitica, E. coli, Enterobacter agglomerans, Caulobacter crescentus, Brucella abortus, Streptomyces sp., Mixoxoccus xanthus, B. subtilis, S. aureus, Str. pneumoniae, Str. mutans, Str. pyogenes, Lactococcus lactis, Enterococcus faecalis, A. tumefaciens*);
- *familia activatorilor transcrierii Ara C* – proteine ce conţin motive *helix-turn-helix*, care se leagă la secvenţe specifice de ADN în *amonte* de genele reglate şi transcrise (ex. Vir F la *S. flexneri*, reglatorul proteinelor Yops la *Yersinia*, al exoenzimelor A şi S de la *Ps. aeruginosa*;
- *reglatorii transcrierii Lys R* – proteine care se leagă la molecula de ADN, în aval de genele reglate şi transcrise (ex. activatorul Spv R de la *Salmonella*, localizat plasmidial, reglează expresia altor factori de virulenţă (Spv A → Spv D), jucând un rol important în supravieţuirea pe termen lung la şoarece);
- *sistemele reglare Fur (feric uptake regulator)* – proteină care leagă ADN numai în prezenţa Fe, iar legarea sa duce la represia tuturor genelor situate în aval. În absenţa Fe, genele sunt transcrise (astfel condiţiile limitative în ceea ce priveşte concentraţia ionilor de Fe pot derepresa expresia factorilor de virulenţă);
- *topologia ADN* – enzime care influenţează gradul de supraspiralizare sau proteine *histon-like* implicate în exprimarea unor factori de virulenţă: factori de invazie la *S. typhimurium*, exprimarea pililor la *Neisseria sp.*, formarea corpilor elementari la *Chl. trachomatis*);
- *factorii alternativi tip* σ – sunt reglatori ai transcrierii, grupaţi în două familii de proteine, σ^{70} şi σ^{54}, care conferă specificitate de recunoaştere a promotorilor de către

ARN-polimerază, contribuie la separarea catenelor de ADN complementare şi la iniţierea transcrierii, fiind implicaţi în expresia factorilor de virulenţă la numeroase specii bacteriene (*Salmonella* sp., *B. bronchiseptica*; *Bacillus* sp.); în prezent, blocarea funcţionării mecanismelor de reglare prin intermediul factorilor σ constituie o nouă abordare în strategiile anti-patogenice (Kazmierczak şi colab., 2005);

- *modificări epigenetice – metilarea post-replicativă* a ADN la nivelul *adeninei*, influenţează virulenţa diferiţilor agenţi patogeni ai omului şi animalelor: *E. coli, Salmonella* sp., *Vibrio* sp., *Yersinia* sp., *Haemophilus* sp. şi *Brucella* sp. Fenomenul ce implică metilarea ADN la bacterii este *variaţia de fază*. În variaţia de fază, gena funcţională se caracterizează prin alternanţa între activitate (*on*) şi inactivitate (*off*).

4.8. Evoluţia bacteriilor patogene

Bacteriile trebuie să se adapteze permanent schimbărilor de mediu pentru a putea supravieţui, elaborând în acest scop strategii evolutive bazate pe diversitatea genetică, realizată prin: *mutaţii punctiforme* (deleţii), *rearanjări genomice* (reversibile sau ireversibile) (de exemplu, variaţia de fază la *Salmonella*, *Moraxella*), *transferul orizontal de gene* (TOG) localizate pe elemente genice mobile (plasmide, fagi, insule de patogenitate).

TOG conduce la *microevoluţie* (apariţia rapidă a noilor variante, în termen de zile/săptămâni, aşa cum este cazul insulelor de patogenitate care pot suferi inserţii sau deleţii specifice de sit care generează rezistenţa la antibiotice) sau la *macroevoluţie* (stabilizarea noilor genotipuri prin mutaţii pato-adaptative şi apariţia variantelor noi, generarea noilor specii, emergenţa noilor genuri bacteriene).

Mutaţiile punctiforme pot apărea la nivelul:

- regiunii promotor (de exemplu, variaţia de fază sau antigenică la meningococ, *Mycoplasma*, *E. coli)*;
- extremităţilor 5' ale genelor de virulenţă;
- genelor reglatoare (factorul alternativ σ);
- genelor structurale – mutaţii pato-adaptative care permit unei bacterii să devină mai bine adaptată la o anumită nişă. Conferind un avantaj adaptativ, mutaţiile se stabilizează în populaţiile bacteriene. Dacă bacteriile mutante pot supravieţui chiar şi în nişele naturale, atunci se va selecta o subpopulaţie de bacterii virulente. Mutaţiile genelor structurale permit adaptarea bacteriilor patogene în absenţa dobândirii unor gene suplimentare. Patogenii oportunişti pot suferi diferite mutaţii pato-adaptative care să favorizeze adaptarea la condiţiile gazdei.

Deleţiile reprezintă unul dintre principiile majore ale plasticităţii genomice. De exemplu, la *Streptomyces*, emergenţa noilor variante are loc prin deleţia unor segmente de 800 kpb. La *B. subtilis* excizia fragmentelor de ADN din regiunea codificatoare duce la apariţia unor noi variante. Deleţia permite integrarea sau excizia plasmidelor, integrarea specifică de sit sau deleţia secvenţială a insulelor de patogenitate.

Insulele de patogenitate sunt unităţi genetice distincte, flancate de secvenţe repetate, cu un conţinut de GC diferit de cel al cromosomului bacterian, de dimensiuni mari (> 30 Kpb) care prezintă mai multe gene de virulenţă, asociate cu gene pentru ARNt şi/sau cu secvenţe de inserţie. Insulele de patogenitate sunt prezente la tulpinile patogene şi absente sau puţin reprezentate la tulpinile nepatogene, sunt instabile şi prezintă gene „mobile" (SI, integrare, transpozaze, origini de replicare plasmidială). Insulele de patogenitate se integrează pe cromosomul bacterian la nivelul genelor pentru ARNt.

Evenimentele de recombinare specifică de sit (deleţii, inversii, amplificare genică, rearanjări ale ADN bacterian mediate de secvenţe de inserţie) conduc la apariţia fenomenului de *variaţie antigenică* (sinteza *pililor* la *N. gonorrhoeae*, *capsulei* la *Str. pneumoniae*), sau la *apariţia unor noi mecanisme de rezistenţă* (rezistenţa la penicilină la *Str. pneumoniae*).

Transferul orizontal al genelor (plasmide, fagi, insule de patogenitate) asigură diseminarea genelor codificatoare pentru factori de virulenţă (adezine, toxine, capsulă, invazine, rezistenţa la antibiotice).

Caracterizarea genelor de patogenitate/virulență se poate realiza experimental prin:

- construcția mutanților (mutații non-letale, mutații monogenice, stabile);
- inserție de Tn care are drept consecință inactivarea genică și permite caracterizarea funcționalității *in vitro* și respectiv, *in vivo*);
- localizarea unei gene inactivate prin hibridizare, caracterizarea numărului de SI prin southern blot, caracterizarea secvențelor flancate prin RFLP, secvențiere;
- clonare și expresia genei într-un vector heterolog pentru identificarea unei posibile funcții ale respectivei gene;
- sonde intragenice;
- primeri de amplificare.

4.9. Relația dintre patogenitate și parazitism

Relațiile dintre bacteriile patogene și organismele gazdă sunt foarte variabile. Multe bacterii infecțioase pot să se dezvolte în mediile naturale și să intre în competiție cu microorganismele indigene. Alteori însă, bacteriile patogene sunt strict dependente de o gazdă animală pentru perpetuarea lor în natură, dar pot supraviețui perioade relativ lungi în mediile naturale.

Dependența absolută de gazdă are mai multe cauze, cea mai probabilă fiind determinată de existența unor exigențe nutriționale complexe.

Modul de viață parazitară implică pierderea funcțiilor ce asigură supraviețuirea în mediile naturale. Evoluția dependenței de gazdă tinde spre o adaptare cât mai eficientă a creșterii *in vivo*. Situația extremă a acestei adaptări este toleranța reciprocă ce evoluează în direcția unei simbioze.

Bacteriile patogene cel mai bine adaptate sunt cel mai adesea capabile de creștere intracelulară, iar cele oportuniste sau facultativ parazite au o localizare extracelulară. Pe această bază s-au descris trei categorii de bacterii parazite: parazite extracelulare, facultativ intracelulare și obligat intracelulare.

Bacteriile parazite extracelulare colonizează în mod normal pielea și mucoasele, deși unele specii invadante se pot dezvolta în sânge și în limfă. Supraviețuirea lor *in vivo* este condiționată de rezistența la fagocitoză. Ele colonizează zone inaccesibile fagocitozei sau sintetizează substanțe cu acțiune antifagocitară: leucocidine și polizaharide capsulare.

Leucocidinele sunt factori de virulență care omoară fagocitele profesioniste. Au fost descrise la *S. aureus, Str. pyogenes, Ps. aeruginosa.*

Multe bacterii patogene sunt omorâte curând după ce au fost ingerate de neutrofile sau de macrofage. Unii agenți patogeni evită fagocitoza sau acțiunea mecanismelor microbicide ale fagocitelor. De exemplu, *S. aureus* are *proteina A* pe suprafața sa, care leagă regiunea Fc a IgG. *Capsula* (la *Str. pneumoniae*) exercită acțiune antifagocitară pe mai multe căi:

- este o barieră fizico-chimică, împiedicând legarea factorilor opsonizanți pe suprafața celulei bacteriene;
- blochează contactul celulei bacteriene cu receptorii fagocitelor;
- are efect chimiotactic negativ.

Puține bacterii (*Capnocytophaga* sp., *Bordetella* sp.) secretă factori solubili sau toxine cu efect inhibitor al chimiotaxiei leucocitelor și inhibă fagocitoza.

Str. pyogenes (grup A) are *proteina M* de suprafață, cu efect antifagocitar; *N. gonorrhoeae* posedă *pili* cu același efect.

Heterogenitatea antigenică a structurilor de suprafață este un factor major al virulenței multor agenți patogeni: s-au identificat peste 90 de variante antigenice ale polizaharidului capsular la *Str. pneumoniae* și peste 150 de variante ale proteinei M la streptococii de grup A. Consecința heterogenității antigenice este că organismul gazdă se apără față de varianta antigenică infecțioasă, dar rămâne sensibil față de celelalte variante.

Bacteriile patogene parazite *facultativ intracelular* se multiplică atât extracelular, dar pot pătrunde și în celulele gazdei. Unele se multiplică în fagocitele "neprofesioniste" sau în alte tipuri de celule, dar nu și în macrofage (de exemplu, *Shigella* sp., *N. gonnorhoeae*). Altele sunt capabile să se

multiplice în fagocitele "neprofesionoiste", dar şi "profesioniste". Ele rezistă atacului enzimelor litice în vacuolele fagosomilor. Rezistența bacteriană se datorează prezenței lipopolizaharidelor pe suprafața celulei.

Bacteriile parazite *obligat intracelulare* se dezvoltă exclusiv în celulele vii, dar pot supraviețui şi în mediile extracelulare.

4.10. Microorganismele oportuniste

Sub această denumire sunt reunite bacterii, microfungi, protozoare care produc infecții la gazde compromise sub raportul capacității de apărare.

Conceptul de "microorganism oportunist" este ambiguu, deoarece definiția nu exclude producerea infecției la o gazdă, ale cărei capacități de apărare sunt depăşite de doza infectantă sau de virulența crescută a microorganismelor.

Pentru microorganismele oportuniste, starea de funcționalitate a mecanismelor de apărare este determinantă în ceea ce priveşte rezultatul interacțiunii sale cu gazda. Microorganismele oportuniste nu au mijloacele eficiente pentru a depăşi mecanismele de apărare ale gazdei. Oportuniştii pot fi foarte adaptați să producă infecții, dar datorită situsului preferat de creştere (de exemplu, suprafața mucoasei) şi a unor condiții preferabile de creştere (de exemplu, condiții de microaerofilie), rareori au şansa să producă procesul patologic.

După von Graevenitz (1977) microorganismele oportuniste pot produce trei tipuri de infecții:

- exclusiv la gazdele compromise imunologic (*Mycobacterium avium*, *Corynebacterium equi*);
- cu o frecvență mai mare la gazdele imuno-compromise (*Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp.);
- mai severe la gazdele imuno-compromise (*Mycoplasma pneumoniae, Salmonella* sp.).

Microorganismele care produc infecția clinică numai la gazde neimunizate (de exemplu, *C. diphteriae*) nu sunt oportuniste.

Microorganismele oportuniste formează o categorie distinctă de a celor saprobionte. Cele saprobionte trăiesc pe materia organică în descompunere şi nu intră în competiție cu microbiota normală a organismului. *Cele oportuniste pot fi saprobionte, nu fac parte din microbiota normală, dar intră în competiție cu microbiota normală a organismului.* Unii membri ai acesteia pot produce infecții oportuniste.

Pentru ca un agent să fie încadrat în categoria microorganismelor oprtuniste, von Graenevitz ia în considerație următoarele condiții:

- microorganismul să fie izolat de mai multe ori din leziuni clinice, de la gazde cu deficit la funcției imuntare;
- sa fie mai frecvent prezent şi izolat de la gazde compromise imunologic, decât de la restul populației;
- prezența sa într-un proces patologic să nu se datoreze unor cauze indirecte.

Ps. aeruginosa supraviețuieşte în diferite soluții, în care substanțele nutritive se găsesc în cantități infime şi chiar în soluțiile dezinfectante. Organismul uman, în mod obişnuit, împiedică colonizarea pseudomonadelor, dar la persoanele imunocompromise şi în rănile provocate de arsuri sau de traumatisme, ca şi în plămânii pacienților cu fibroză chistică, *Ps. aeruginosa* este adesea prezent.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. EVOLUŢIA PROCESULUI INFECŢIOS

5.1. Etapele procesului infecţios

O primă etapă a procesului infecţios constă în pătrunderea şi colonizarea ţesuturilor gazdei la poarta de intrare în organismul gazdă (tabelul 4), ceea ce presupune mobilizarea unor strategii microbiene care să depăşească bariera de apărare anti-infecţioasă cutaneo-mucoasă.

Intoxicaţia botulinică, fără colonizarea organismului gazdă reprezintă o excepţie. *Cl. botulinum* se multiplică în alimentele conservate şi produce toxina, care, odată ingerată cu alimentele contaminate, determină intoxicaţia.

Tabelul 4.

Porţile de intrare pentru diferiţi agenţi patogeni în organismul uman

	Patogen	Boala	Perioada de incubaţie
Tractul respirator	*Str. pneumoniae*	Pneumonia pneumococică	Variabilă
	M. tuberculosis	TBC	Variabilă
	B. pertussis	Tusea convulsivă	12–30 zile
	Virusul *influenza*	Gripa	18–36 h
	Virusul *rujeolei (Morbillivirus)*	Rujeola	11–14 zile
	Virusul *rubeolei (Rubivirus)*	Rubeola	2–3 săpt.
	Virusul Epstein-Barr (Lymphocryptovirus)	Mononucleoza infecţioasă în Europa, limfomul Burkitt în Africa ecuatorială, carcinom nazo-faringian în Japonia	2–6 săpt.
	Varicella zoster (Varicellavirus)	Varicela	14–16 zile
	Histoplasma capsulatum	Histoplasmoza	5–18 zile
Tractul gastro-intestinal	*Shigella*	Dizenteria bacilară	1–2 zile
	Brucella	Bruceloza/febră ondulantă	6–14 zile
	S. enteritidis	Salmoneloze	7–22 h
	S. tyhphimurium		
	S. cholerasuis		
	S. typhi	Febra tifoidă	14 zile
	Virusul *hepatitei A*	Hepatita acută A	15–50 zile
– –	*Paramyxovirus*	Oreion	2–3 săpt.
	Trichinella spiralis	Trichineloză	2–28 zile
Tractul genitor-urinar	*N. gonorrheae*	Gonoree	3–8 zile
	T. pallidum	Sifilis	9–90 zile
	Chl. trachomatis	Uretrită negonococică	1–3 săpt.
	HSV – 2	Herpes	4–10 zile
	HIV	SIDA	10 ani
	Candida	Candidoză	
Piele sau ruta parenterală	*Cl. perfringens*	Gangrenă gazoasă	1–5 zile
	Cl. tetani	Tetanus	3–21 zile
	Ricketssia ricketssii	Febra Munţilor Stâncoşi	3–21 zile
	Virusul *hepatitei B (Hepadnavirus)*	Hepatita B	6 săpt.–6 luni
	Virusul *rabic (Lyssavirus)*	Rabia	10 zile–1 an
	P. malariae	Malaria	2 săptămâni.

La nivelul tractului respirator superior, intestinului, tractului uro-genital, microorganismele patogene intră în competiţie cu microbiota rezidentă, care exercită în mod direct şi indirect activitate antimicrobiană (prin privarea de substanţe nutritive, ocuparea siturilor de legătură de la suprafaţa mucoasei, producerea substanţelor inhibitoare). Efectul protector al microbiotei rezidente este contracarat de microorganisme prin intermediul unei varietăţi de factori, care le conferă capacitatea de a invada gazda, de a se răspândi în ţesuturi şi de a supravieţui mecanismelor de apărare ale acesteia.

Dacă agenţii patogeni rămân localizaţi la poarta de intrare în cursul întregului proces infecţios se produce *infecţia localizată* (neinvazivă). O formă particulară a infecţiei localizate este infecţia de focar, caracterizată de constituirea unui *focar de inflamaţie*, adică o reacţie de apărare locală a organismului, cu mobilizarea şi aglomerarea leucocitelor. Rezultatul inflamaţiei este *supuraţia* la nivel cutanat şi la nivelul mucoaselor respiratorie, digestivă, urinară, genitală. Febra reumatismală este

considerată ca o infecție tipică "de focar", în timpul căreia streptococul localizat la poarta de intrare (amigdale) elimină substanțe cu efect alterativ și alergizant.

În alte cazuri, microorganismele cantonate la poarta de intrare secretă toxine care disemineză sistemic și își manifestă acțiunea la distanță (de exemplu, *C. diphteriae, Cl. tetani*) (fig. 54). În aceste cazuri, infecția locală are caracterul unei toxiinfecții. De exemplu, *Cl. tetani* se multiplică în plaga anaerobă provocată de rănire, iar toxina ajunge prin difuzie axonală retrogradă, la motoneuronii din coloanele anterioare ale măduvei, unde își exercită efectul. În mod similar, *C. diphteriae* se multiplică pe mucoasa faringiană, iar toxina determină efecte patologice la distanță, asupra fibrei musculare cardiace, celulei nervoase sau glandelor suprarenale.

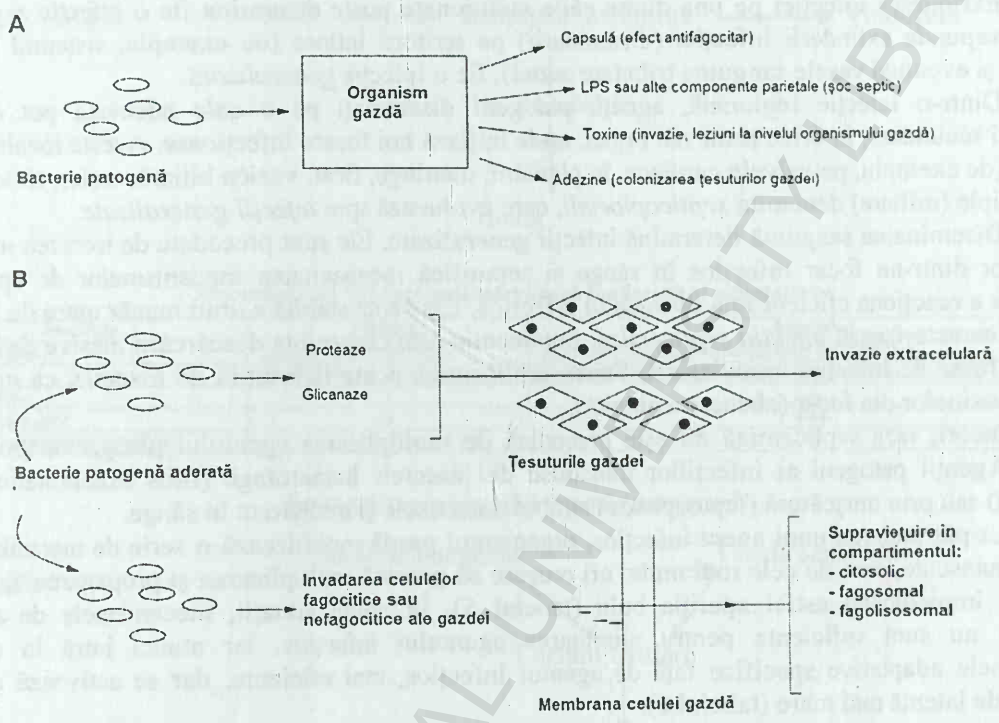


Fig. 54. Evoluția sistemului gazdă – agent infecțios (după Wilson et al., 2002).

Toxiinfecțiile alimentare sunt rezultatul consumului alimentelor infectate (carne, lapte, ouă) provenite de la animalele bolnave sau contaminate în timpul manipulării. De exemplu, *Salmonella* sp. și *S. aureus* se multiplică excesiv în alimente (carne) și concomitent se acumulează endotoxine și respectiv enterotoxine.

Consumul alimentelor echivalează cu ingestia unei culturi bacteriene. Concomitent cu efectele toxinelor se manifestă și procesul infecțios inițiat de celulele vii ingerate, de colonizare a mucoasei intestinale.

Unii agenți patogeni, după o perioadă inițială de multiplicare la poarta de intrare, se răspândesc la distanță pe diferite căi generând *infecțiile invazive*:

- prin *contiguitate*, tipică agenților infecțioși cu multiplicare intracelulară (virusuri, rickettsii). După eliberare prin necroza celulei, prin înmugurire, prin permeabilizarea sau ruperea membranei, agenții infecțioși infectează celulele sensibile învecinate;
- prin *continuitate*, în cazul agenților patogeni care se multiplică într-un țesut prevăzut cu un sistem canalicular. De exemplu, infecțiile respiratorii progresează de la nivelul tractului respirator superior spre bronhii (bronșite), țesutul pulmonar (pneumonii), pleure (pleurite), în timp ce la nivelul tractului urogenital și a căilor biliare, infecția progresează ascendent, de la nivelul uretrei spre rinichi. De la nivelul apendicelui, agentul diseminat poate produce peritonita;
- *pe cale limfatică*. De la nivelul focarului infecțios primar, agenții infecțioși sunt preluați de curentul limfatic. Consecința imediată este inflamarea vaselor limfatice și a

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ganglionilor regionali (limfadenita). Infecția poate progresa prin deversarea limfei în sânge, rezultatul fiind *bacteriemia* sau *viremia*.

Bacteriemia semnifică prezența unui număr mic de bacterii în torentul circulator, pentru o perioadă strict limitată de timp. Sistemele de apărare, în special sistemul fagocitar elimină bacteriile circulante. Bacteriemia este consecutivă proceselor infecțioase acute pulmonare, intervențiilor chirurgicale, extracției dentare, absorbției intestinale și chiar periajului dentar. În sânge, cu rare excepții (bacilul cărbunos, al pestei) bacteriile nu se multiplică.

De aceea, prezența lor în sânge semnifică o eliberare dintr-un focar de infecție, atât de abundentă, încât, temporar, depășește capacitatea protectoare a mecanismelor de apărare a organismului.

Extinderea infecției pe una dintre căile menționate poate determina fie o infecție *regională*, care corespunde extinderii infecției (diseminarii) pe teritorii întinse (de exemplu, sistemul limfatic regional și eventual vasele sanguine tributare zonei), fie o infecție *generalizată*.

Dintr-o infecție regională, agenții patogeni diseminați pe o cale adecvată pot dobândi localizări secundare, în orice țesut sau organ, unde inițiază noi focare infecțioase. Aceste localizări pot fi unice (de exemplu, pe valvele cardiace, în plămâni, meninge, ficat, vezica biliară, creier, rinichi etc.) sau multiple (miliare) denumite *septicopioemii*, care evoluează spre *infecții generalizate*.

Diseminarea sanguină determină infecții generalizate. Ele sunt precedate de trecerea masivă a bacteriilor dintr-un focar infecțios în sânge și semnifică incapacitatea mecanismelor de apărare a gazdei de a reacționa eficient față de agentul infecțios. Existența stabilă a unui număr mare de bacterii în sânge caracterizează *infecția septicemică*. Septicemia este consecința descărcării masive de bacterii dintr-un focar de infecție, vascularizat. Starea septicemică poate fi însoțită de toxemie, ca urmare a difuziei toxinelor din focar (abces, meningită).

Uneori, faza septicemică nu este precedată de multiplicarea agentului patogen la poarta de intrare. Agenții patogeni ai infecțiilor transmise de insectele hematofage (tifos exantematic, febra recurentă) sau prin mușcătură (leptospiroze) străbat mucoasele și trec direct în sânge.

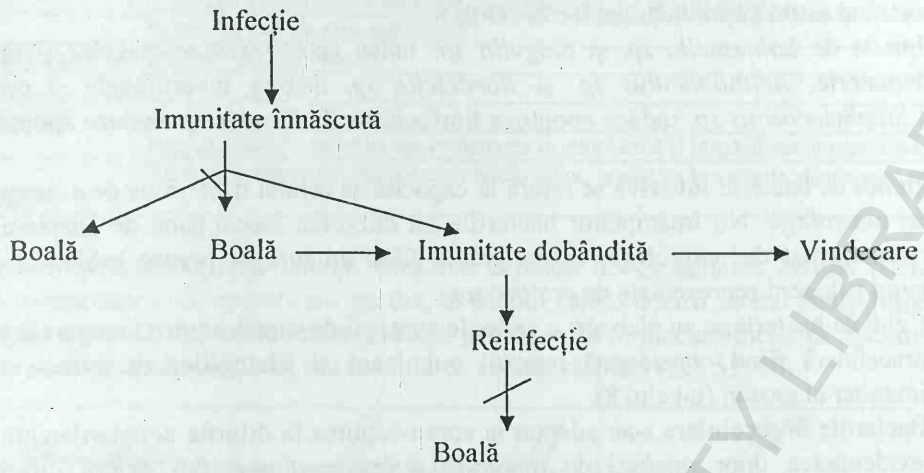
La pătrunderea unui agent infecțios, organismul gazdă mobilizează o serie de mecanisme de apărare înnăscute, care de cele mai multe ori reușesc să prevină multiplicarea și propagarea agentului infecțios, împiedicând astfel apariția bolii (tabelul 5). În unele situații, mecanismele de apărare înnăscute nu sunt suficiente pentru eliminarea agentului infecțios, iar atunci intră în acțiune mecanismele adaptative specifice față de agentul infecțios, mai eficiente, dar se activează după o perioadă de latență mai mare (tabelul 6).

Tabelul 5.

Mecanisme de apărare anti-infecțioasă la nivelul barierei cutaneo-mucoase.

Poarta de intrare	Mecanisme de apărare anti-infecțioasă
Țesut cutanat	Desicație pH acid Variațiile de temperatură Descuamarea celulelor epiteliale Microbiota rezidentă la acest nivel (competiție pentru siturile de aderență și colonizare) Foliculii piloși și glandele sebacee (conțin lizozim și lipide toxice cu efect microbicid) Țesutul limfoid subcutanat (SALT)
Mucoasă	Stratul de mucină reprezintă o barieră fizică, care captează bacteriile Stratul de mucus conține: lizozim, sIgA care previne atașarea bacteriilor la celulele mucoasei, lactoferină (prin legarea Fe previne multiplicarea bacteriilor; lactoperoxidază; cu efect microbicid (prin generarea radicalului superoxid). Descuamarea periodică a celulelor mucoasei îndepărtează bacteriile aderate la joncțiunile strânse și previne invazia printre celulele mucoasei Țesutul limfoid asociat submucoasei (MALT)
Mucoasa conjunctivală	Reflexul de clipire îndepărtează periodic microorganismele ajunse la acest nivel Secreția lacrimală (conține lizozim, sIgA, Lf)
Nazofaringe	Microbiota rezidentă Secreții (lizozim, sIgA, Lf, fagocite)
Tractul respirator superior	Mucus Mișcări ciliare
Plămân	Macrofage
Cavitate bucală	Descuamarea periodică Salivă (conține lizozim, sIgA, microbiota rezidentă, Lf)
Stomac	pH scăzut Enzime proteolitice
Intestin subțire	Descuamarea periodică Viteza mare a fluidului
Colon	Viteza scăzută a fluidului Descuamarea periodică Microbiota rezidentă abundentă.

Principala caracteristică a răspunsului adaptativ la o anumită infecție este instalarea memoriei imunitare.

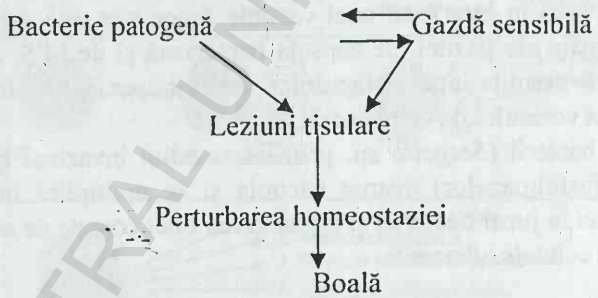


Tabelul 6..

Mecanisme de apărare anti-infecțioasă înnăscută și adaptativă.

Imunitate	*Înnăscută*	*Adaptivă*
Factori solubili	Lizozim, complement, CRP	Ac eficienți față de microorganisme extracelulare
Celule	NK, fagocite	Limfocite T /eficiente față de microoganisme intracelulare
Primoinfecție	+	+
Infecție secundară	+	+++
Memorie imunologică specifică	–	+

Interacțiunea gazdă-bacterie patogenă



Leziunile tisulare sunt rezultatul producerii toxinelor sau a unor răspunsuri exagerate din partea gazdei infectate (tabelul 7), mediate de interleukine pro-inflamatorii, activarea focarelor inflamatorii, inducerea sintezei autoanticorpilor care pot conduce la distrugerea țesuturilor (de exemplu, sechelele reumatismale după infecția cu *Streptococcus sp.*, spondilita anchilozantă după infecțiile cu *Klebsiella sp.*), activarea policlonală a limfocitelor T de către superantigenele bacteriene, cu efect mitogen asupra celulelor efectoare specifice ale răspunsului imun celular (enterotoxinele stafilococice, toxinele sindromului de șoc toxic, exotoxinele streptococice pirogenice, glicoproteinele de suprafață de la *Mycoplasma* sau glicoproteinele virale).

Tabelul 7.

Imunitate și imunopatologie post-infecțioasă

R.I. protector		Răspuns imun exagerat
Imunitate strict adaptativă: - alogenică - tranzitorie		Alergii Autoantigene (HLA)
Ac protectori: - neutralizanți; - opsonizanți (C, FcγR); - citotoxici		Ac facilitatori, autoanticorpi
R.I.:	- T_4 – TH_1 (macrofag)/TH_2 (Ac)	Reacții de hipersensibilitate
	- T_8 – citotoxic	Celule autoreactive
Citokine: IFNγ, TNFα, IL-2		TNFα, IL-1 → șoc septic mediat de LPS

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecțiile bacteriene pot modula apoptoza celulelor gazdei, inițiia inflamația sau evita mecanismele de apărare ale gazdei (de exemplu, *M. avium* și BCG blochează apoptoza celulelor gazdei, favorizând astfel supraviețuirea lor în celulă).

Tulpinile de *Salmonella sp.* și *Shigella sp.* induc apoptoza macrofagelor și inițiază astfel reacția inflamatorie; *Actinobacillus sp.* și *Bordetella sp.* distrug macrofagele și evită acțiunea fagocitelor; *Staphylococcus sp.* induce apoptoza limfocitelor T, *Listeria sp.* induce apoptoza celulelor dendritice.

Noțiunea de bacterie invazivă se referă la capacitatea celulei bacteriene de a supraviețui și/sau multiplica în macrofage. Nu întâmplător bacteriile au dezvoltat mecanisme de adaptare la modelul intracelular reprezentat de macrofage, aceste celule fiind un surogat pentru habitatele naturale ale anumitor agenți patogeni reprezentate de protozoare.

Celulele bacteriene au elaborat o serie de strategii de supraviețuire în macrofage, adaptarea la viața intracelulară fiind considerată punctul culminant al strategiilor de evitare a efectorilor sistemului imunitar al gazdei (tabelul 8).

Bacteriile intracelulare s-au adaptat la supraviețuirea în diferite compartimente ale celulei. Odată cu evidențierea unor markeri de maturare și transport specifici pentru diferite vezicule intracitoplasmatice, s-a dovedit că bacteriile intracelulare ocupă compartimente intracelulare foarte variate. Astfel *Shigella* sp., *Listeria* sp., *Rickettsia* sp. lizează membrana vacuolară și ajung în citoplasmă, un mediu bogat în nutrienți, *Coxiella sp.* poate supraviețui în mediul lizosomal, iar *Salmonella* sp., *Mycobacterium* sp., *Legionella* sp. inhibă fuziunea fagosomului cu lizosomul.

Pentru a pătrunde în celula gazdă *Salmonella sp.* și *EPEC sp.* induc influxul Ca^{2+}, în timp ce *Shigella sp.* utilizează proteinele Rho pentru a induce polimerizarea actinei. *Shigella* sp. și *Salmonella sp.* produc rearanjări tranzitorii ale filamentelor de actină, în timp ce *EPEC* induce formarea unei formațiuni de tip piedestal.

Supraviețuirea în interiorul unei vacuole fagocitare este mediată de enzime care degradează proteinele lizozomale ale gazdei, de capsula bacteriană și de LPS. *Salmonella sp.* supraviețuiește în mediu acid care îi permite sinteza factorilor necesari pentru persistență, în timp ce *Legionella* sp. previne acidifierea veziculei de endocitoză.

Anumite bacterii (*Shigella* sp. prin intermediul invazinei IpaB sau *Listeria* sp. cu ajutorul listeriolizinei și fosfolipazelor) distrug vacuola și se multiplică în citoplasmă. După liză, are loc condensarea actinei în jurul bacteriei și organizarea unei comete de actină care propulsează bacteria în citoplasmă și spre celulele adiacente.

Tabelul 8.

Mecanismele prin care diferiți agenți patogeni invadează celulele gazdei.

Specia bacteriană	Caracterul invaziv	Relația cu celulele gazdă	
Yersinia	Invazivă	β – integrine	Fagocitoză prin mecanism de fermoar, bazolaterală, activată de tirozinkinază
	Yad A	β – integrine	
	Ail	?	
L. monocytogenes	Internalină (IntA)	E-cadherină	Fagocitoză prin mecanismul de fermoar
Sh. flexneri	Ipa B-D	α5β – integrină	Văluri membranare, rearanjări majore ale citoscheletului
EPEC	Invazivă	Hp 90	Formarea piedestalurilor și aderență intimă, invazie slabă (dependentă de actină și microtubuli), acumularea citoscheletului sub bacterii mediată de tirozinkinază.

Majoritatea bacteriilor induc reorganizarea filamentelor de actină pentru a penetra în interiorul celulei eucariote, cu unele excepții (*Neisseria sp.*, *Campylobacter sp.* sau *Klebsiella sp.* nu se multiplică în interiorul celulei gazdă), care utilizează microtubulii.

Bacteriile intracelulare se diseminează prin disocierea joncțiunilor intercelulare, cu traversarea membranei bazale și deversarea în sânge sau limfă.

Un rol major în invazie îl au celulele M care posedă microvilozități la suprafața lor și care au o puternică activitate de endocitoză și conținut lizosomal redus, fiind capabile să internalizeze antigene particulate din lumenul intestinal ce nu sunt degradate și vor fi prezentate macrofagelor (de exemplu, antigenele de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp.) (tabelul 9).

Tabelul 9.

Interacțiunea unor agenți patogeni cu celulele M.

E.coli RDEC-1	Distrugerea microvililor/formarea piedestalurilor, nu are loc invazia
V. cholerae	Preluat în vacuole prin endocitoză
Campylobacter jejuni	Invazia activă în vacuole
Y. enterocolitica	Idem
Y. paratuberculosis	Idem
Sh. flexneri	Invazia activă în vacuole, apoi eliberarea în citoplasmă și răspândirea intercelulară
S. typhi *S. typhimurium*	Voaluri membranare, degenerarea microvililor, preluarea în vacuole, distrugerea celulelor M.

Succesul progresiei unei infecții invazive depinde de capacitatea celulei bacteriene de a interfera cu mecanismele de apărare ale gazdei, în scopul supraviețuirii interacțiunii inițiale cu prima linie de apărare a gazdei, dezvoltării unor strategii pentru evitarea mecanismelor de apărare ale gazdei, alterarea directă a componentelor RI sau modularea acestui răspuns (fig. 55, 56).

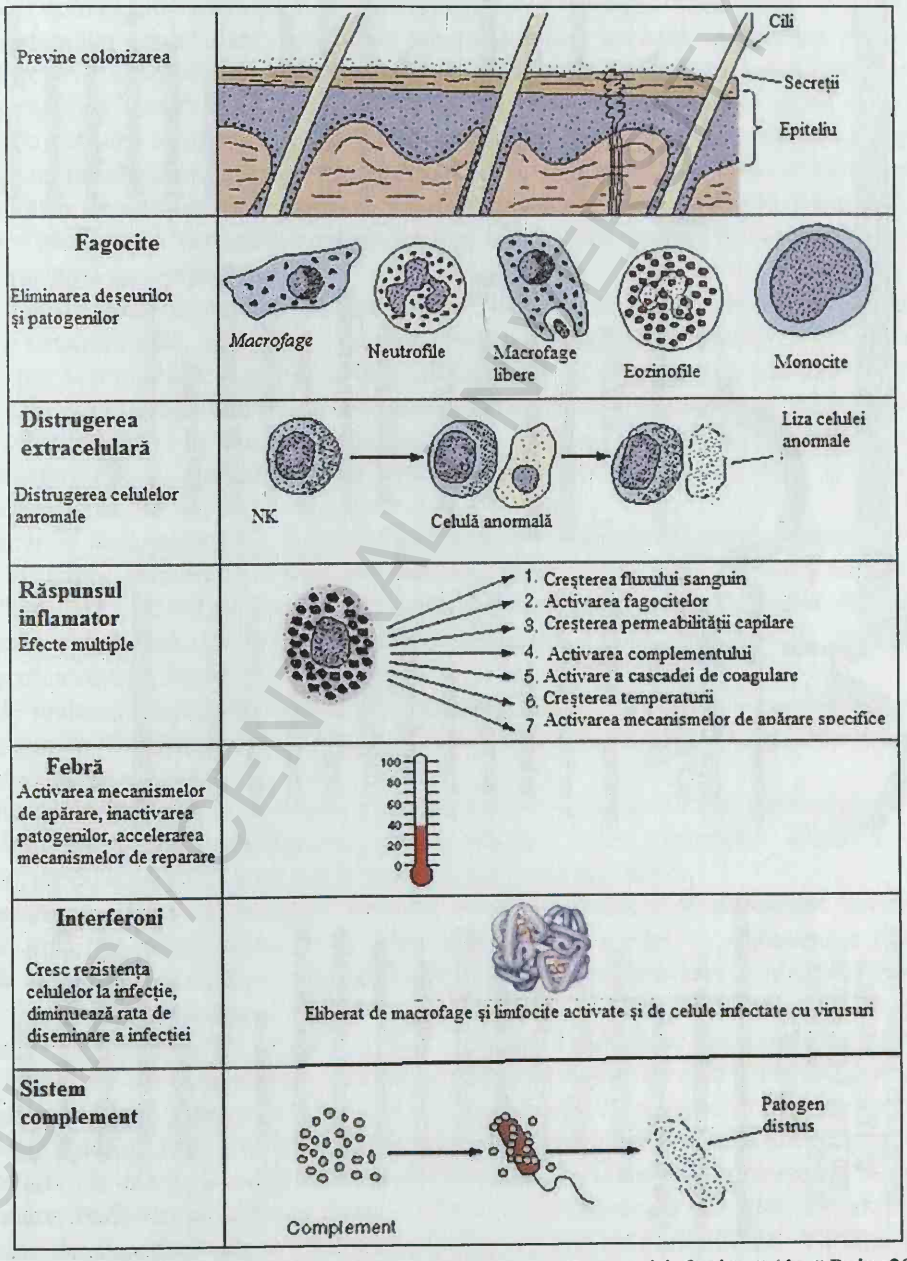


Fig. 55. Ilustrarea schematică a mecanismelor nespecifice de apărare anti-infecțioasă (după Roitt, 2004).

Fig. 56. Etapele procesului infecțios

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Interacţiunea celulelor bacteriene cu efectorii imunitari ai gazdei se realizează prin legarea celulelor bacteriene de proteinele matricii extracelulare şi mascarea antigenelor de suprafaţă bacteriană, evitarea fagocitozei, inhibarea RFC (prin intermediul capsulei, LPS), degradarea proteinelor complementului, strategii de preluare a Fe, variaţia antigenică a moleculelor de suprafaţă, legarea de regiunea Fc a moleculelor de Ig prin proteina A (*S. aureus*), legarea la heparină prin intermediul hemaglutininelor filamentoase FHA (*B. pertussis*).

Mecanisme prin care microorganismele evită apărarea gazdei

Infecţiozitatea microorganismelor patogene este dependentă de capacitatea lor de a coloniza ţesuturile gazdei şi de a contracara mecanismele de apărare a gazdei. Capacitatea de variaţie rapidă a moleculelor de suprafaţă este o trăsătură evolutivă comună în tot spectrul patogenilor. Unele bacterii patogene au elaborat mecanisme ce permit *variaţia antigenică* rapidă şi eficientă a unor componente ale suprafeţei, precum şi fenomenul *variaţiei de fază*. Rata înaltă de mutaţie produce un număr mare de variante antigenice.

Cel mai comun mecanism prin care microorganismele patogene realizează evaziunea în raport cu efectorii sistemelor moleculare şi celulare ale gazdei este *variaţia antigenică* a componentelor suprafeţei. Structurile suprafeţei celulare sunt ţintele majore ale răspunsului imun humoral. Termenul de "variaţie antigenică" sau "comutare fenotipică" se referă la capacitatea unei specii microbiene de a-şi modifica specificitatea antigenică a componentelor de suprafaţă. Aceeaşi structură (flageli, fimbrii, proteine ale membranei externe, polizaharidul capsular) se sintetizează în *variante biochimice diferite*, mărind capacitatea de colonizare a ţesuturilor gazdei şi de evitare a factorilor imunitari. Informaţia genetică pentru producerea variantelor antigenice este disponibilă oricând în celulă, dar la un moment dat o singură variantă este exprimată.

Variaţia de fază semnifică posibilitatea comutării reversibile *on-off* a genelor, ceea ce înseamnă că o structură dată, este sau nu produsă. Pentru bacterii, rata variaţiei de fază este de 1/100–1/1000/generaţie. Comutarea *on-off* în variaţia de fază semnifică pierderea sau câştigul reversibil al unei structuri de suprafaţă a celulei şi se datorează *plasticităţii fenotipice* a microorganismelor în general şi a celor patogene în special. Într-o populaţie clonală, după diviziune, majoritatea celulelor vor păstra caracterele fazei parentale, dar o minoritate vor comuta expresia fazei. Comutarea este un eveniment aleatoriu.

Moleculele de suprafaţă ale agenţilor patogeni se caracterizează prin secvenţe de variabilitate accentuată a structurii primare. Ele sunt codificate de genele unei familii mari, prezente în variante multiple, ce formează o adevărată *serie polialelică*. Regiunile conservate ale moleculelor de suprafaţă sunt ancorate în membrană, iar secvenţele expuse mediului extern şi sistemului imunitar al gazdei prezintă un grad accentuat de variaţie individuală.

Ratele înalte de mutabilitate ale genei (genelor) codificatoare par să producă un număr mare de forme antigenice distincte. Variabilitatea genetică este o modalitate de adaptare a organismelor la condiţiile variabile ale mediului.

O altă sursă importantă de variaţie antigenică, ce poate fi o sursă potenţială de evaziune a sistemului imunitar, este *modificarea post-traducere*. De exemplu, adăugarea grupărilor polizaharidice, modifică într-un grad foarte înalt antigenitatea suprafeţei.

Generarea unui înveliş antigenic versatil, cu o rată înaltă a modificărilor biochimice, oferă organismului infecţios modalitatea de a evita efectul neutralizant al anticorpilor. De exemplu, patogeneza *N. gonorrhoeae* este condiţionată de rolul esenţial al fimbriilor pentru ataşarea de celulele epiteliale. *N. gonorrhoeae* expune 3 antigene ale suprafeţei celulare, care îşi modifică specificitatea antigenică cu o rată foarte înaltă: LPS prezintă 6-8 variante biochimice, proteinele membranei externe aparţin unui număr de 10–12 tipuri, iar variaţia antigenică a fimbriilor este nelimitată, specifică pentru fiecare tulpină bacteriană. Moleculele de fimbrilină evidenţiază secvenţe constante, semivariabile şi hipervariabile. Regiunile hipervariabile determină antigenitatea acestor structuri şi tropismul faţă de celulele epiteliale ale tractului urogenital uman. Numărul variantelor antigenice de *N. gonorrhoeae* este atât de mare, încât fiecare tulpină pare a fi distinctă antigenic de celelalte tulpini. Fiecare dintre cele 3 antigene de suprafaţă are mecanisme genetice proprii de variabilitate. Variaţia antigenică a gonococului permite evitarea răspunsului imun al gazdei.

N. meningitidis este capsulată şi numai fimbriile proemină dincolo de limitele stratului polizaharidic. De aceea, pierderea fimbriilor inhibă proprietatea de aderenţă la suprafaţa epiteliilor.

Polizaharidul capsular este *repelent* pentru fagocite, deoarece celulele fagocitare nu au receptori pentru polizaharidele capsulare. Uneori, acestea sunt asemănătoare oligozaharidelor din moleculele glicoproteice proprii organismului, ceea ce explică slaba lor imunogenitate. Tulpinile variante, necapsulate, sunt mai puţin virulente, dar au avantajul că nu sunt recunoscute de anticorpii specifici faţă de antigenele capsulare. Absenţa capsulei, la *H. influenzae*, conferă celulei o capacitate sporită de a se ataşa şi de a invada celulele epiteliale ale gazdei.

La *Str. pyogenes* s-au identificat peste 80 de serotipuri diferite, ce rezultă din mutaţiile punctiforme ale genei ce codifică *proteina M*, componentă a peretelui celular.

LPS protejează fizic celula bacteriană de acţiunea complementului şi a fagocitelor, constituind un strat protector, iar diversitatea glucidelor din polizaharidul terminal, conferă o variaţie antigenică extrem de largă. La. *S. typhimurium* s-au identificat peste 2500 de variante antigenice ale polizaharidului regiunii externe a LPS (antigenul O) şi ale flagelinei, cu tot atâtea specificităţi serologice. La *E. coli* sunt peste 150 de variante antigenice ale antigenului O şi peste 100 de variante ale antigenului K (capsular).

Tipul antigenic al bacteriilor poate fi marker al virulenţei, dată fiind natura clonală* a agenţilor patogeni. De exemplu, *V. cholerae* tip O1 şi antigenul O de tip 139 produc toxina holerică, dar foarte puţine dintre celelalte tipuri antigenice O au această proprietate.

* Populaţia de celule a unui agent patogen izolat dintr-un proces infecţios are natură clonală, toate celulele fiind descendente ale unui număr mic de celule identice din punct de vedere genetic.

Microorganismele care leagă acidul sialic* pe suprafaţa lor, îşi maschează situsurile antigenice critice şi evită sau inhibă efectorii imunităţii înnăscute. Avantajul selectiv al acidului sialic de suprafaţă, pentru supravieţuirea microorganismelor sau pentru persistenţă, este foarte mare.

* Denumirea de acid sialic vine de la cuvântul grec *sialon* = salivă, deoarece s-au descoperit în mucina glandelor salivare submaxilare. După unii autori, acizii sialici sunt nu numai cele mai interesante molecule ale lumii vii, dar şi cele mai importante. Acidul sialic (mai rar denumit acid neuraminic) desemnează o familie de peste 40 de cetoacizi naturali, cu 9 atomi de C. Sunt unici în lumea vie, deoarece sunt singurii derivaţi ai glucidelor cu 9 atomi de C, ce se găsesc la procariote.

Sinteza acidului sialic este limitată la metazoarele din grupul deuterostomienilor. Plantele, protostomienii (insecte, arahnide, crustacei, moluşte, cefalopode şi nematode) şi fungii nu au niveluri detectabile de acizi sialici, ceea ce sugerează că divergenţa căii evolutive a sintezei sale s-a făcut timpuriu în evoluţie.

Tapetarea suprafeţei celulare cu acid sialic este o modalitate eficientă de evitare a imunităţii înnăscute a gazdei. Microorganismele infecţioase utilizează mai multe strategii pentru acoperirea suprafeţei cu acid sialic:

- unele microorganisme sintetizează acidul sialic, care constituie o subunitate repetitivă a polizaharidului capsular la *E. coli* K_1 sau la *N. meningitidis*, care împiedică legarea de/şi invazia celulei gazdă, dar protejează bacteria de mecanismele imunităţii înnăscute. Sialil-transferaza implicată în sializarea lipooligozaridelor (LOS) este legată de membrană şi este expusă la suprafaţă, având acces la substratul sializat al gazdei. Sializarea LOS conferă meningococilor rezistenţă la mecanismele imunităţii înnăscute, cum ar fi fixarea C independentă de anticorpi;
- la unele tulpini de *N. gonorrhoeae* legarea acidului sialic la suprafaţă este catalizată de o sialil-transferază extracelulară;
- *T. cruzi, T. brucei, C. diphteriae* etc. utilizează o trans-sialidază a suprafeţei proprii: în mod obişnuit sialidaza transferă acidul sialic de la substratul sializat, la apă (hidroliză). Trans-sialidaza transferă acidul sialic la restul galactozil terminal sau la N-acetil-glucozamina unui receptor al suprafeţei parazitului (lactoza, respectiv lactozamina). Trans-sialidaza agentului patogen sializează nu numai moleculele endogene (proprii), dar şi moleculele celulei gazdă. Acceptorii endogeni ai acidului sialic sunt molecule asemănătoare mucinei, care după sializare protejează *Tripanosoma* din sânge de factorii protectori ai imunităţii înnăscute. Remodelarea prin sializare a glicoconjugatelor de

suprafață ale parazitului și ale celulelor gazdei este importantă pentru virulența sau pentru persistența paraziților transmiși de vectori;

– *H. influenzae* preia acidul sialic al gazdei prin transportori de mare afinitate (TRAP), îl activează și îl transferă la lipooligozaharid (LOS), moleculă asemănătoare cu LPS, dar căreia îi lipsește antigenul somatic O.

La spirocheta *Borrelia hermsii* (agentul febrei recurente, caracterizată prin crize febrile, separate de intervale asimptomatice), episoadele febrile semnifică apariția și multiplicarea unei noi variante antigenice. Antigenul variant este o *proteină* abundentă *a membranei externe* (VMP = *v*ariable *m*ajor *p*rotein).

Mecanismul general al *microorganismelor eucariote* patogene pentru generarea variabilității componentelor de suprafață, este existența și *activarea succesivă a unui set de gene multiple care codifică sinteza aceleiași structuri chimice în variante chimice și antigenice distincte.* Genele sunt organizate în familii, care permit generarea unui repertoriu extins de variante antigenice.

Unul dintre cele mai studiate exemple de variație antigenică este al tripanosomelor africane care produc boala somnului. *T. brucei* (tripanosoma africană), agentul cauzator al bolii somnului, produce infecții persistente, cu valuri de parazitemie, datorită generării periodice a unor populații de celule ce diferă prin specificitatea antigenică a glicoproteinei majore a suprafeței (VSG). Succesiunea noilor variante antigenice este trăsătura biochimică determinantă a parazitului, iar ciclurile de parazitemie se succed, în absența tratamentului, până la sfârșitul letal al gazdei. În stadiile finale ale infecției, invazia și proliferarea în țesuturi și organe depășesc mijloacele de apărare ale gazdei.

Glicoproteina de virulență a suprafeței parazitului (VSG) este antigenul major, recunoscut de sistemul imunitar. Celulele individuale de *Tripanosoma* exprimă o singură variantă antigenică a VSG. În cursul infecției persistente, majoritatea celulelor parazitului sunt sensibile la acțiunea neutralizantă a anticorpilor, dar un număr mic de paraziți *comută la sinteza unei noi variante antigenice de VSG* și evită astfel acțiunea neutralizantă imediată a răspunsului imun mediat humoral, stimulat de populația parentală. Rata de variație antigenică este evaluată la $1/10^2$–10^7 celule. Celulele noii variante antigenice se multiplică și refac populația parazitului, mai bine adaptată pentru evaziunea efectorilor imunitari. Capacitatea de comutare periodică la noi variante antigenice ale VSG are ca rezultat epuizarea rezervelor de apărare, iar în final parazitul invadează țesuturile și sistemele de organe.

Celulele de *T. brucei* au capacitatea potențială de a expune în cursul unui proces infecțios peste 100 de variante antigenice ale VSG, codificate de un număr echivalent de gene, care formează o casetă genică și sunt transcrise coordonat, de la un număr limitat de promotori.

Glicoproteinele VSG sunt alcătuite din 400–500 aminoacizi și au o variație amplă a secvenței. Studiile de cristalografie cu raze X sugerează o uniformitate remarcabilă a conformației tridimensionale. Secvența primară a aminoacizilor este mai bine conservată la capătul carboxil, prin intermediul căruia molecula VSG se ancorează în membrana citoplasmatică a parazitului. VSG formează un monostrat compact pe suprafața parazitului, astfel încât numai o parte a moleculei este accesibilă legării anticorpilor. Învelișul glicoproteic pare a avea rolul de protecție a suprafeței parazitului de atacul sistemelor de apărare, inclusiv de atacul fagocitelor.

Infecția cu *P. falciparum* este persistentă, recurentă și se caracterizează printr-un tablou foarte variabil al manifestărilor clinice. Imunitatea specifică se dezvoltă lent și numai după infecții ample și repetate se consolidează un răspuns imun protector față de infecția severă, dar este o imunitate incompletă și incapabilă să sterilizeze organismul. În ariile geografice cu o rată înaltă de transmitere a parazitului, apar complicații severe, cu mortalitate crescută, la copiii sub 5 ani. Copiii care depășesc 5 ani au imunitate adecvată pentru a controla infecția. Starea de protecție persistă tot restul vieții, în condițiile inoculării continue a sporozoiților de la țânțarii infectați. Răspunsul imun față de antigenele parazitului este mediat de anticorpi (IgG), dar este condiționat de un set de citokine secretate de celule imunitare și neimunitare. Astfel s-ar explica faptul că la pacienții cu SIDA (care exacerbează dramatic evoluția tuberculozei sau infecțiile oportuniste), malaria nu are o evoluție mai severă, ceea se înseamnă că sinteza IgG este independentă de celulele T. Eritrocitele infectate sunt ingerate de macrofage, independent de IFN.

Severitatea diferită a infecției se datorează gradului diferit de virulență a agentului infecțios. Diversitatea antigenică a tulpinilor de *Plasmodium* este argumentată de miniepidemiile de malarie severă, care apar în zonele endemice. Generarea continuă a diferitelor populații variante antigenice de

paraziți, cu diferite specificități de aderență, este cauza infecțiilor persistente caracterizate prin unde de parazitemie și manifestări clinice specifice malariei. Severitatea miniepidemiilor este explicată prin variația proprietăților de *citoaderență* a eritrocitelor infectate, ca factor major al virulenței agentului malariei. Pe suprafața eritrocitelor infectate este expusă o diversitate de antigene ale parazitului, ceea ce favorizează aderența de diferite țesuturi. Astfel, eritrocitele infectate în stadiul matur al parazitului *P. falciparum*, prin antigenele membranare pe care le expun, pot fi reținute și sechestrate în alte țesuturi, în afara splinei: în creier, ficat. Aderența eritrocitelor infectate la țesutul cerebral, renal sau hepatic, este cauza formelor severe de malarie, cum ar fi *malaria cerebrală.*

Rata variației antigenelor expuse pe suprafața eritrocitelor este de circa 2% / generație, ceea ce duce într-un timp scurt la generarea unor populații foarte diverse de paraziți, atât în ceea ce privește antigenele de suprafață, cât și în capacitatea de a se lega de diferite molecule ale celulelor tisulare, inclusiv de endoteliul postcapilar și chiar de eritrocitele neinfectate.

În esență, modificarea proprietăților de antigenitate și citoaderență ale parazitului condiționează manifestările severe ale infecției malarice și favorizează persistența parazitului în competiție cu mecanismele de apărare ale gazdei și producerea infecțiilor repetate.

Un alt țesut care sechestrează eritrocitele infectate, este placenta. În perioada sarcinii, sensibilitatea la infecția cu malarie crește semnificativ, cu consecințe grave. Se crede că în țesutul placentei se găsește o mare densitate a receptorilor (condroitin-sulfatul A) prin intermediul cărora antigenele parazitului se fixează pe eritrocite.

Diversitatea fenotipică corespunzătoare variației antigenice este o strategie foarte eficientă pentru adaptarea la presiunea selectivă pe care o exercită efectorii răspunsului imun și la diversitatea de particularități structurale și funcționale ale țesuturilor gazdei. Mecanismele de variație sunt deosebit de importante pentru succesul diseminării unei infecții în populația gazdă.

Rolul citokinelor în procesul patologic infecțios

Citokinele sunt proteine sau glicoproteine, cu greutate moleculară mai mare de 5 kDa, ce pot fi secretate de orice celulă a organismului, cu posibila excepție a eritrocitelor, care se leagă și activează o varietate de celule. Citokinele sunt componente care participă la păstrarea homeostaziei mediului intern. Spre deosebire de hormoni, a căror acțiune se manifestă la distanță, citokinele acționează la nivel local.

Citokinele sunt implicate în toate etapele procesului patologic. Ele își produc efectele biologice numai după ce se leagă la receptorii specifici de mare afinitate de pe suprafața celulelor țintă, activează căile de semnalizare celulară și eventual comută un set particular de gene. Genele activate codifică sinteza unei varietăți de proteine: receptori de aderență intercelulară, proteaze, factorul de agregare plachetară, enzimele ce metabolizează lipidele, NO-sintaza și citokine, inclusiv citokina stimulatoare inițială. Efectele citokinelor sunt diverse: stimularea diviziunii și diferențierii celulei, inhibiția diviziunii sau apoptoza, stimularea chemokinezei (deplasarea orientată a celulei).

Afinitatea receptorilor de citokine pentru liganzii specifici este foarte înaltă (10^{-9} –10^{-15}). Majoritatea celulelor au un număr mic (sute sau câteva mii) de receptori. Activarea celulelor și producerea efectelor *in vivo* este indusă de un număr mic de molecule, care se fixează pe receptorii specifici.

Denumirea multor citokine reflectă activitatea biologică atribuită: TNF α (factorul de necroză tisulară) are efecte proinflamatorii, dar are o slabă activitate citotoxică (necrotică); TGF β (factorul de creștere al celulelor T) este un inhibitor al diviziunii celulelor epiteliale, astfel că denumirile citokinelor nu reflectă totdeauna efectele lor.

Citokinele proinflamatorii, IL-1, IL-6, TNF (cea mai puternică este IL-6) îndeplinesc următoarele funcții:

- stimulează ficatul să sintetizeze *proteinele de fază acută*. Proteinele de fază acută au rolul de opsonine și favorizează fagocitoza;
- induc sinteza *moleculelor de aderență intercelulară*: moleculele familiei selectinelor P și E, care leagă liganzii glucidici ai leucocitelor și determină încetinirea deplasării și fenomenul de rostogolire pe suprafața endoteliului, în focarul inflamator. Alți receptori endoteliali de aderență sunt moleculele de aderență intercelulară și vasculară ICAM/

VCAM (*intercellular cell adhesion molecules*)/(*vascular cell adhesion molecules*). Aceştia se leagă cu afinitate înaltă de contrareceptorii membranei leucocitului, denumiţi *β-integrine*, o familie de proteine heterodimerice (Henderson, 1996). Interacţiunea dintre integrine şi ICAM determină oprirea leucocitelor circulante şi trecerea în ţesutul conjunctiv (diapedeză). Leucocitele circulante exprimă constitutiv β2-integrine, dar într-o conformaţie nefuncţională. β2-integrinele pot fi activate sub acţiunea unor factori chimiotactici (IL-8). Se crede că bacteriile comensale induc sinteza unor citokine inhibitorii ale reacţiei inflamatorii.

Citokinele anti-inflamatorii inhibă procesul inflamator : IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, TGF ß.

Citokinele au o redundanţă enormă. Ele se activează în cascadă şi constituie o reţea complexă ce mediază interacţiunile dintre celule. Citokinele produse de o celulă induc sinteza în celulele sensibile a unui set de citokine, care include citokina de iniţiere.

5.2. Condiţiile de apariţie a procesului infecţios

Simpla prezenţă a unui microorganism patogen în mediul înconjurător nu este suficientă pentru a produce o infecţie la o gazdă sensibilă. Pentru iniţierea procesului infecţios sunt necesare următoarele condiţii obligatorii: existenţa unui *izvor de infecţie*, a unei *căi de eliminare* a agentului infecţios, a unei *căi de transmitere* şi a unei *porţi adecvate de intrare* în organismul sensibil. Domeniul specializat al patologiei infecţioase care studiază căile de eliminare, transmitere şi pătrundere a agenţilor patogeni în organism se numeşte *epidemiologie*.

a) *Izvorul de infecţie*

Necesitatea existenţei izvorului de infecţie derivă din faptul că mediul extern (sol, apă, aer) este nefavorabil creşterii şi multiplicării majorităţii agenţilor patogeni. Mediul extern asigură, cel mult, condiţii de supravieţuire temporară a microorganismelor şi de păstrare a infecţiozităţii virusurilor. Perpetuarea microorganismelor patogene în natură este condiţionată de existenţa unui izvor sau rezervor de infecţie, în care agentul patogen se multiplică. Aici se realizează procesul de acumulare naturală, de unde agentul patogen se diseminează şi contaminează alte organisme.

Izvorul de infecţie este diferit, în funcţie de agentul patogen şi de spectrul său de gazdă. Unele microorganisme şi virusuri infectează numai gazdele animale şi produc *zoonoze*, omul fiind infectat în situaţii accidentale. Alteori, agenţii patogeni produc boli infecţioase (transmisibile) strict caracteristice omului (denumite *antroponoze*) fără să infecteze organisme animale. În acest caz, omul reprezintă unicul izvor de infecţie în natură, cum este cazul unor viroze (variola, varicela, oreionul, poliomielita, guturaiul, gripa, hepatite) sau bacterioze (dizenteria bacteriană, febra tifoidă, febrele paratifoide, tusea convulsivă, sifilisul, gonoreea, lepra). În alte cazuri (febra tifoidă, scarlatina, difteria, poliomielita, holera), agentul infecţios este transmis atât de omul bolnav, cât şi de cel sănătos, *purtător* de agenţi patogeni. În unele cazuri, purtătorii sunt foştii bolnavi care s-au imunizat, nu mai prezintă simptome clinice, dar păstrează în organism agentul patogen, temporar sau pentru totdeauna, pe care îl elimină în mediu. Purtătorii sunt foarte importanţi pentru diseminarea agenţilor patogeni în mediul extern, deoarece fiind aparent sănătoşi sunt greu de depistat şi se deplasează liber în colectivităţi unde pot transmite infecţia la organismele receptive.

O altă categorie de boli infecţioase comune omului şi animalelor este reprezentată de *antropozoonoze*. Izvorul de infecţie este reprezentat de animale domestice sau sălbatice: câinele pentru rabie, febra butonoasă, leptospiroze; bovinele pentru salmoneloze, vaccină, bruceloză, tuberculoză, febra Q; şobolanul pentru salmoneloze, leptospiroze, febra muşcăturii de şobolan (febra *sodoku*), turbare, pestă (ciumă), tifos murin; păsările pentru encefalite virale, ornitoze, salmoneloze etc.

Controlul antropozoonozelor este foarte dificil pentru că în circuitul agentului patogen intră animalele salbatice. De exemplu, turbarea este răspândită la vulpe, veveriţă, liliac, de unde este transmisă la câine, iar de la câine la om. Chiar dacă incidenţa bolii scade după imunizarea câinilor prin vaccinare, virusul nu se poate elimina din populaţiile de animale sălbatice.

Unele microorganisme patogene se dezvoltă în primul rând în mediile naturale (apă, sol) şi numai accidental infectează gazdele: de exemplu, agenţii tetanosului şi ai gangrenei gazoase. Agenţii se multiplică în sol şi pentru a se menţine nu este necesară transmiterea la o gazdă. *Cl. botulinum*,

agentul botulismului, se dezvoltă numai în sol, de unde ajunge în conservele alimentare, se multiplică şi produce toxina, care după ingestie produce manifestări patologice.

b) *Calea de eliminare a agenţilor patogeni*

Agenţii patogeni care se multiplică în izvorul natural de infecţie sunt eliminaţi în mediu şi pot să infecteze gazde noi. Calea de eliminare este condiţionată de localizarea lor specifică în organism. Principalele căi de eliminare a agenţilor patogeni sunt cea intestinală şi cea respiratorie.

Calea *intestinală* este comună bacteriilor enterotrope, prin intermediul materiilor fecale, care pot conţine intermitent sau continuu, cantităţi mari de agenţi patogeni ai febrelor tifoide şi paratifoide, dizenteriei, holerei, ai toxiinfecţiilor alimentare, precum şi virusuri (virusul hepatitei A, virusul polio).

Calea respiratorie asigură răspândirea agenţilor patogeni ai maladiilor respiratorii (difteria, tusea convulsivă, rujeola, variola, varicela, oreionul, gripa, guturaiul), prin intermediul secreţiilor nazofaringiene şi bucale, proiectate în timpul tusei, strănutului, vorbirii. Pe această cale, omul bolnav sau infectat răspândeşte în jur o pulbere fină de aerosoli constituiţi din picături microscopice de secreţii încărcate cu agenţi patogeni. Într-un strănut se pot elimina între 10000–100000 celule bacteriene. Cele rezistente la uscăciune îşi păstrează viabilitatea pentru perioade lungi de timp, ataşate de particulele inerte.

Alte căi de eliminare a agenţilor patogeni sunt reprezentate de: răni şi supuraţii (în cazul infecţiilor produse de stafilococi, streptococi, bacilul piocianic, clostridiile gangrenei gazoase); calea urinară (pentru agenţii febrei tifoide, leptospirozei, febrei Q, tuberculozei renale); secreţia lactată (pentru agenţii brucelozei, tuberculozei, febrei Q).

Pentru agenţii patogeni care produc infecţii generalizate şi care nu au o cale naturală de eliminare din organism, ieşirea se realizează prin intermediul unui artropod hematofag care se hrăneşte cu sângele infectat (de exemplu, agenţii tifosului exantematic, ai pestei, ai encefalitelor virale, ai paludismului) sau ieşirea se face pe cale artificială, prin seringă sau instrumente chirurgicale infectate (agenţii hepatitelor virale B, C, D, ai sifilisului) (cale iatrogenă).

c) *Calea de transmitere a agenţilor infecţioşi*

După ce au fost eliminaţi din organismul bolnav sau purtător, agenţii patogeni trebuie să fie transmişi la o nouă gazdă receptivă. Transmiterea se realizează în mai multe modalităţi.

Transmiterea prin *contact direct* are loc în cazul în care, între organismul infectat şi cel receptor există o legătură directă şi se face prin *muşcătură* (agenţii turbării, ai febrei muşcăturii de şobolan), prin *supt* (la animale, agenţii febrei Q, tuberculozei, iar la om, *M. tuberculosis*, agenţii infecţiilor piogene), prin *sărut* (agenţii tuberculozei pulmonare, sifilisului, mononucleozei infecţioase), prin contact *cutanat* direct (agenţii dermatomicozelor, furunculozei), prin contact *sexual* (agenţii sifilisului, gonoreii, HIV). Când agentul cauzal este transmis prin căile genitale, infecţia se numeşte *venerică*.

De cele mai multe ori, transmiterea infecţiei este *indirectă*, prin interpunerea, mai mult sau mai puţin evidentă, a unui factor de mediu neanimat denumit *vehicul,* sau a unui organism denumit *vector*, între izvorul de infecţie şi organismul receptor:

- transmiterea prin intermediul produselor alimentare – carne, lapte, ouă, în cazul în care provin de la animale infectate sau sunt contaminate prin manipulare de către o persoană (bolnavă sau purtătoare) care elimină agenţi patogeni. Bacteriile patogene se multiplică de regulă în produsele alimentare. Astfel se transmit agenţii febrei tifoide, ai toxiinfecţiilor alimentare (cu *Staphylococcus* sp. şi *Salmonella* sp.), ai febrei Q, ai infecţiei cărbunoase, ai botulismului, ai tuberculozei;
- transmiterea prin intermediul obiectelor folosite de un bolnav (veselă, rufe, îmbrăcăminte, cărţi, jucării etc.) este posibilă un timp limitat după contaminarea acestora, proporţional cu rezistenţa agenţilor patogeni la condiţiile de mediu (agenţii tuberculozei, difteriei, scarlatinei, variolei);
- transmiterea prin vectori se realizează prin intermediul artropodelor, în special hematofage (insecte, capuşe), care preiau agenţii patogeni de la gazda infectată şi îi transmit la o nouă gazdă, fie prin înţepătură, fie depunându-i pe tegumentul intact sau lezat. Uneori, vectorul are numai *rol mecanic* pentru agentul patogen, pe care îl transportă în tubul digestiv sau pe suprafaţa corpului. Musca este vector mecanic pentru agentul patogen al febrei tifoide, al dizenteriei. Alteori, vectorul este el însuşi infectat şi realizează o *transmitere biologică*. În

acest caz, agentul patogen se multiplică masiv în corpul vectorului (de exemplu, *Ricketsia prowazeki*, agentul tifosului exantematic) sau străbate o fază a ciclului său vital (de exemplu, sporozoitul de *Plasmodium*, în corpul ţânţarului). Flavivirusurile (agenţii encefalitelor) se multiplică în organismul artropodelor vectoare, fără să producă leziuni tisulare;

- transmiterea prin intermediul aerului se face prin inhalarea picăturilor septice, răspândite de un bolnav sau de un purtător de agenţi patogeni. Cele mai eficiente sunt picăturile septice foarte mici (nuclei), care pot rămâne în suspensie în aer (ca aerosoli), mult timp după eliminarea lor din organism. Astfel se transmit agenţii gripei, guturaiului, rujeolei, rubeolei, varicelei, scarlatinei, tusei convulsive;
- transmiterea hidrică este proprie infecţiilor intestinale (agenţii febrelor tifoidă şi paratifoidă, holerei hepatitei A, enterovirozelor) şi leptospirozelor şi se produc prin contaminarea accidentală a unei surse de aprovizionare cu apă, cu agenţii patogeni proveniţi din dejecţii umane sau animale;
- transmiterea prin intermediul solului are loc în cazul unor plăgi, de regulă adânci, în care au fost antrenate granule de sol. Astfel se transmit infecţiile cu *B. anthracis*, cu *Cl. tetani*, agenţii gangrenei gazoase (*Welchia perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum*).

d) *Poarta de intrare în organism*

Pentru ca agenţii patogeni să determine o boală infecţioasă este necesar ca ei să învingă barierele naturale protectoare ale gazdei. Poarta de intrare în organism corespunde, în general, căii prin care s-a facut eliminarea agentului patogen din organismul infectat.

De cele mai multe ori, poarta de intrare în organism este reprezentată de *calea respiratorie* (în infecţii ca oreionul, guturaiul, gripa, rujeola, variola, varicela, difteria, tusea convulsivă, scarlatina), *calea digestivă* (febra Q, hepatita virală A, poliomielita), *calea cutanată* (infecţia cărbunoasă, tularemia, febra Q, agenţii infecţioşi transmişi prin muşcătură, prin înţepătura vectorilor, prin rănire).

Unii agenţi patogeni pătrund în organismul receptiv pe mai multe căi, din care una este principală, dar determină aceleaşi manifestări indiferent de poarta de intrare. Alţi agenţi produc maladii cu caractere clinice diferite, în funcţie de poarta de intrare, ca *unic factor determinant* şi fără relaţie cu vreun caracter biologic particular al agentului patogen. De exemplu, *B. anthracis*, după pătrunderea pe cale tegumentară produce cărbunele cutanat, iar după ingestia alimentelor contaminate produce un proces patologic intestinal. Dacă infecţia se face pe cale respiratorie, rezultatul este infecţia pulmonară.

Infecţia reprezintă totalitatea proceselor biologice care se desfăşoară în organismul uman sau animal, ca urmare a pătrunderii şi multiplicării agenţilor patogeni.

Pentru iniţierea procesului infecţios, agentul patogen trebuie să pătrundă în organism pe o cale adecvată, iar organismul să fie receptiv (să permită multiplicarea agentului infecţios). În concepţia modernă, procesul infecţios trebuie interpretat ca rezultat al interacţiunii dinamice dintre micro- şi macroorganism. În concepţia ecologică, agentul infecţios este forţa motrice a procesului infecţios, iar reactivitatea imunitară a organismului condiţionează intensitatea, extinderea, gravitatea şi însăşi posibilitatea apariţiei procesului infecţios.

În raport cu momentul în care se face infecţia organismului uman şi animal se disting patru tipuri de infecţii.

a) Infecţia *germinală* se produce în cazurile în care ovulul sau spermatozoidul sunt purtătorii agentului infecţios, pe care-l transmit celulei-ou (pe verticală), odată cu caracterele ereditare. Acest mecanism de infecţie nu s-a demonstrat la om şi nici la animalele superioare. A fost descris la artropode (căpuşe din genul *Ornithodorus, Dermacentor, Rhipicephalus*), infectate astfel cu bacteria spiralată *Borrelia recurentis*, agentul patogen al febrei recurente de căpuşe. Ele devin astfel, rezervoare naturale de infecţie.

b) Infecţia *transplacentară* (intrauterină) este demonstrată şi la om. Uneori este condiţionată de producerea prealabilă a unor leziuni placentare sub acţiunea agentului patogen, ca de exemplu, *T. pallidum, Brucella* sp., *Coxiella burnetii* (agentul febrei Q). Alteori, infecţia are loc fără modificări placentare (infecţia variolică, rujeolică, hepatică etc.).

c) Infecţia *intrapartum* se produce în timp ce fătul traversează căile genitale (la expulzie), cu microorganisme patogene ale tractului genital matern (oftalmia şi conjunctivita gonococică a nou născuţilor).

d) Infecția *postpartum* se produce după naștere. În această categorie sunt cuprinse majoritatea infecțiilor omului și animalelor. Ele se manifestă în special după epuizarea imunității pasive, conferită de transferul anticorpilor materni prin placentă și colostru.

În raport cu originea microorganismelor care le produc, infecțiile sunt de două categorii:

- *exogene*, provocate de microorganisme care pătrund pe o cale adecvată;
- *endogene*, provocate de microorganisme autohtone (indigene), potențial patogene ale microbiotei normale, datorită scăderii rezistenței locale sau generale a gazdei, după iradiere, după tratamentul cu medicamente citotoxice, hormoni corticosteroizi, malnutriție, obstrucția căilor de excreție. Aceste infecții nu induc un răspuns imun detectabil și au tendința să revină ciclic sau să evolueze lent.

5.3. Modalități de evoluție a procesului infecțios

Infecția poate evolua în două modalități: *inaparent* sau *aparent*, ca boală infecțioasă.

Infecția *inaparentă* caracterizează acele situații în care procesul infecțios nu se exteriorizează prin simptomatologie clinică. De exemplu, infecția tuberculoasă inaparentă se detectează prin reacția de hipersensibilitate întârziată la tuberculină. Reacția este pozitivă la un procent mare de indivizi, dar maladia tuberculoasă clinică se manifestă la un procent mic din totalul persoanelor pozitive pentru testul tuberculinei. De cele mai multe ori, infecțiile inaparente se detectează prin reacții serologice *in vitro* sau prin reacții de hipersensibilitate *in vivo*. Uneori, infecția asimptomatică poate fi mortală. Explicația constă în paralizia mecanismelor de apărare a gazdei.

Infecția *aparentă* este cea care se manifestă printr-un ansamblu de semne clinice obiective și subiective, specifice și nespecifice, consecințe ale alterărilor produse de agentul infecțios și de produsele activității sale.

Maladia infecțioasă prezintă următoarele caracteristici; a) este produsă de microorganisme vii sau de toxine ale microorganismelor; b) poate realiza o imunitate specifică de durată variabilă; c) organismul bolnav poate deveni sursă de îmbolnăvire a indivizilor sănătoși; d) este specifică, în sensul că aceeași maladie este produsă întotdeauna de același agent cauzal, deși sub formă clinică se poate prezenta sub aspecte variate.

Etapele maladiei infecțioase

În evoluția sa, procesul infecțios aparent parcurge mai multe etape distincte, separate in timp.

Perioada de incubație sau perioada inițială este intervalul de timp scurs între momentul pătrunderii agentului patogen în organism și acela al debutului maladiei. Această perioadă este lipsită de simptome clinice evidente și are o durată variabilă (zile, săptămâni, luni sau este foarte scurtă), în funcție de natura agentului patogen, iar pentru același agent, în raport cu doza infectantă, cu virulența agentului patogen și cu reactivitatea imunitară a gazdei. Pentru infecțiile *exogene*, durata incubației se poate determina relativ precis, prin infecția experimentală a animalelor de laborator sau a voluntarilor. Pentru infecțiile *endogene,* perioada de incubație nu se poate determina. Din momentul contaminării este posibilă scurgerea unei perioade foarte lungi de timp până când microorganismul poate să inițieze un proces infecțios. În această perioadă, agentul patogen se multiplică, se localizează la nivelul situsului receptiv și eventual elaborează substanțe toxice.

Cel mai adesea, agenții infecțioși manifestă un organotropism evident, legat de faptul că, în general, fiecare specie își găsește condițiile optime de dezvoltare într-un anumit țesut. De exemplu, indiferent de calea de pătrundere, vibrionul holeric se localizează în intestinul subțire, bacilul dizenteric – în mucoasa intestinului gros, *Brucella* – în placenta bovinelor și ovinelor, datorită concentrației mari de eritrol (dar nu în placenta umană), *R. prowazeki* – în celulele epiteliale ale capilarelor SNC, *B. pertussis* – exclusiv în mucoasa bronșică.

B. anthracis se multiplică în orice țesut, chiar și în sânge.

Debutul bolii este marcat de momentul în care numărul de agenți infecțioși și cantitatea de toxine acumulate au atins un nivel critic. Debutul poate fi brusc sau lent și este caracterizat din punct de vedere clinic, prin instalarea (bruscă sau gradată) a semnelor bolii: febră, cefalee, frisoane, algii musculo-articulare. Debutul marchează începutul perioadei de invazie a agentului infecțios de la locul

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

multiplicării primare sau al eliberării unei cantități prag de toxină, spre noi zone sensibile, iar din punct de vedere cronologic și clinic semnifică începutul *perioadei de stare*.

Perioada de stare este intervalul de timp în care maladiile infecto-contagioase își desfășoară un tablou clinic cu simptome caracteristice, de amplitudine maximă, decisivă pentru evoluția ulterioară. În această perioadă poate surveni decesul.

La sfârșitul perioadei de stare, simptomele dispar brusc – *in crisis* (de exemplu, în pneumonia bacteriană), însoțită de sterilizarea bacteriologică sau lent – *in lysis* (în cazul febrei tifoide). Organismul se poate steriliza sau poate să rămână infectat pentru o perioadă nedefinită de timp.

În perioada de stare, organismul se imunizează abundent cu antigene ale agentului patogen și se sintetizează anticorpi. Imunizarea are ca rezultat, de regulă, sterilizarea bacteriologică sau virologică a organismului. Uneori, organismul nu se sterilizează și în focarele de infecție greu accesibile efectorilor răspunsului imun, agentul persistă, consecința fiind o *infecție cronică*.

Convalescența este perioada de timp în care organismul își reface potențialul de activitate, anterior îmbolnăvirii.

Infecția cronică corespunde unei stări de echilibru între agentul infecțios și organismul gazdă, caracterizată prin faptul că vindecarea clinică (dispariția simptomelor) nu este însoțită de sterilizarea organismului. Focarele de infecție cronică au localizări greu accesibile factorilor de apărare ai organismului sau medicației: în SNC, în viscerele parechimatoase (ficat, rinichi, splină), în sinusurile osoase, în glandele bine încapsulate (prostata). Infecția cronică poate să persiste fără simptome clinice (sifilisul latent) sau poate evolua cu reacutizări intermitente la diferite perioade (bruceloza, tuberculoza, sifilis terțiar).

Starea de purtător este fie consecința unei infecții cronice, fie a persistenței pentru o perioadă de timp, a unui focar de infecție, în organismele clinic sănătoase. Uneori, foștii bolnavi tolerează la nivelul mucoaselor agentul patogen pe care îl elimină timp de câteva săptămâni (*Str. pyogenes, C. diphteriae, V. cholerae*). Alteori, bacteriile și virusurile sunt eliminate pentru perioade îndelungate (de ordinul anilor): *S. typhimurium* rămâne localizată în vezica biliară, de unde se elimină intermitent, iar bolnavii de difterie pot rămâne purtatori ai bacilului *C. diphteriae*. Purtătorii creează probleme dificile din punct de vedere epidemiologic, deoarece reprezintă izvoare de infecție greu de depistat. Purtătorii sunt foarte periculoși pentru sănătatea publică, mai ales dacă vin în contact cu alimentele, ca -manipulatori sau preparatori ai acestora.

Tipuri de evoluție epidemiologică a infecției

Din punct de vedere epidemiologic, maladia infecțioasă poate evolua pe mai multe niveluri de extindere spațio-temporală și incidentală:

- *evoluția sporadică* semnifică apariția cazurilor izolate de îmbolnăvire, atât în timp, cât și în spațiu;
- *evoluția endemică* este definită prin apariția cazurilor relativ rare de infecție, care se mențin numeric constante într-o colectivitate și apar cu relativă regularitate, de obicei sezonier, la intervale variabile de timp. Majoritatea indivizilor populației sunt imunizați și deci indemni față de agentul infecțios;
- *evoluția epidemică*, caracterizează evoluția rapidă a unei infecții într-un interval scurt de timp, cu un număr mare de cazuri clinice într-o colectivitate (cămin, cazarmă, sat, regiune, țară). Se cunosc epidemiile de ciumă, gripă, rujeolă, scarlatină;
- *evoluția pandemică* este aceea în care maladia infecțioasă se extinde foarte rapid pe un teritoriu foarte larg (țări, continente), cu un număr foarte mare de cazuri clinice. Este caracteristică infecției gripale și este favorizată de mijloacele de deplasare rapidă, la distanțe foarte mari.

Față de un agent patogen, absent în mod obișnuit dintr-un areal, populația poate fi foarte susceptibilă. La primul contact cu populația receptivă, agentul patogen declanșează o epidemie explozivă, dar odată cu instalarea stării de imunitate specifică, incidența maladiei scade.

Dacă agentul patogen își modifică specificitatea antigenică, epidemia evoluează și într-o populație imunizată, deoarece, față de noile variante antigenice, populația nu posedă anticorpi specifici.

Epidemiile sunt condiționate de standardul de viață al comunității. Maladia tuberculoasă este o reflectare a acestei condiții, în timp ce bolile venerice sunt favorizate de promiscuitatea sexuală.

Bibliografie selectivă

1. Ahmed N., Dobrindt U., Hacker J., Hasnain S. E. 2008. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. Nature Reviews Microbiology. 6:387–394
2. Balotescu M. C., Israil A. 2001. *Fenomenul de quorum-sensing bacterian.* Bact. Virusol. Parasitol. Epidemiol., 2001, 47: 5
3. Baron S. 2006. NCBI » Bookshelf » Medical Microbiology » Bacteriology » Bacterial Pathogenesis » Detection of Endotoxin in Medical Solutions
4. Barth H., Aktories K., Popoff M. R., Stiles B.G. 2004. Binary bacterial Toxins: Biochemistry, Biology and Applications of Common Clostridium and Bacillus Proteins – MMBR 68, 3, pp. 373–408.
5. Barton N. H., Bricks D. E. J., Eisen, J., Goldstein D. B, Patel N.H. Evolution. 2007–2009. Cold Spring Harbor Laboratory Press. All rights reserved.
6. Bhavsar A. P., Guttman J. A., Finlay B. B. 2007. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. Nature 449: 827–834
7. Bolstad A. J., Jensen H. B., Bakken V. 1996. Taxonomy, biology and periodontal aspects of Fusobacterium nucleatum – Clin. Microbiol. Rev. vol. 9, pp. 55–71.
8. Brooks G. F., Caroll K.C., Butel J. S., Morse S.A. 2007. Jawets, Melnick & Adelberg Medical Microbiology, 24th Ed.
9. Casadesus J., Low D.2006. Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World – MMBR. 70 (3): 830–856.
10. Coburn B., Sekirov I., Finlay B.B., 2007. Type III Secretion Systems and Disease – Clin. Micr. Reviews 20, 4, pp. 535–549.
11. Cornelis G. R. 2002. The Yersinia Ysc–Yop 'Type III' weaponry. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 742–754
12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284(5418):1318–22.
13. De Kievit T. R., Iglewski B. H. 2000. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. Infection and Immunity. 68 (9): 4839–4849
14. del Pozo J. L., Patel R. 2007. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 82. 204–209
15. Donlan M. R., Costerton J. W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15: 167–193.
16. Dune W. M. Jr. 2002. Bacterial Adhesion: Seen any Good Biofilms Lately? – Clin. Micr. Reviews, 15, 1, 155–166.
17. Geny B., Popoff R. M. 2006. Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. Biology of the Cell 98: 667–678
18. Ghosh P. 2004. Process of Protein Transport by the Typ III Secretion System . MMBR. 68, 4: 771–795.
19. Hase C. C.,. Finkelstein R. A. 1993. Bacterial extracellular zinc-containing Metalloproteases. Micr. Rev. 57, 4: 823–837.
20. Hassa, P., Haenni S. S., Elser M., Hottiger M. O. 2006. Nuclear ADP-ribosylation Reactions in Mammals cells. MMBR, 70, 3: 789–829.
21. Henderson B., Poole S., Wilson M. 1996. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis – Microbiol. Rev. 60 (2):316–341.
22. Henderson I. R., Garcia F.N., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D. 2004. Type V Secretion Pathway: the Autotransporter Story. MMBR 68, 4, pp. 692–744.
23. http://d3jonline.tripod.com/10-Bacteria/Microbial_Virulence.htm
24. http://d3jonline.tripod.com/10-Bacteria/Microbial_Virulence.htm
25. http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm
26. http://lib.bioinfo.pl/courses/view/312
27. http://lib.bioinfo.pl/courses/view/312
28. http://www.dartmouth.edu/~gotoole/swarm.html
29. Kaiser G. E. Doc Kaiser's Microbiology Home Page, Updated: Oct. 12, 2005
30. Kazmierczak M. J., Wiedmann M., Boor K.J. 2005. Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 69, 4:527–543
31. Krueger K. M., Barbieri J. T. 1995. The family of bacterial ribosylating exotoxins – Clin. Microbiol. Rev. vol. 8, pp. 34–47.
32. Miethke M., Marabiel M. A. 2007. Siderophore – Based Iron Acquisition and Pathogen Control. MMBR. 71(3): 413–451.
33. Moran C. A. 2009. Nutritional approaches to controlling *Salmonella.* Pig Progress. Net. 25 (2)
34. Neilands J. B. 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. J.Biol. Chem. 270: 26723–26726.
35. Nizet V., Esko J. D. 2009. Bacterial and Viral Infections. Essentials of Glycobiology. CSH Press
36. Reid; C. W., Fulton; K. M., Twine S. M. 2010. Never Take Candy from a Stranger: The Role of the Bacterial Glycome in Host–Pathogen Interactions. Future Microbiology. 5(2):267–288.
37. Sears C. L.,. Kaper J. B. 1996. Enteric bacterial Toxins: Mechanisms of Action and linkage to Intestinal Secretion – Microbiol. Rev. 60(1): 250–265.
38. Vimr E. R., Kalivoda K. R., Deszo E. L., Steenbergen S. S., 2004. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism – MMBR, 68, 1, pp. 132–153. 0
39. Wilson J . W., Schurr M. J., LeBlanc C. L., Ramamurthy R., Buchanan K. L., Nickerson C. A. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Postgrad Med J. 78:216–224
40. www.chem.duke.edu/~alc/labgroup/research
41. http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Images/15-01_adherence_1.jpg
42. Caiazza N. C., Merritt J. H., Brothers K. M., O'Toole G. A. 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by Pseudomonas aeruginosa PA14. J Bacteriol.189(9):3603-12. Epub 2007 Mar 2.

6. COCI PIOGENI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ

Cocii piogeni de importanţă medicală sunt implicaţi în etiologia unui spectru foarte larg de infecţii supurative şi non-supurative.

Cocii Gram pozitivi (*Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes* şi *Str. pneumoniae*) (fig. 57) generează infecţii supurative şi produc circa 1/3 din totalul infecţiilor bacteriene umane (amigdalite, pneumonii, toxiinfecţii alimentare, infecţii cutanate, şocuri toxice severe).

Cocii Gram negativi piogeni sunt reprezentaţi de două dintre speciile genului *Neisseria*: *N. gonorrhoeae* şi *N. meningitidis* (fig. 57).

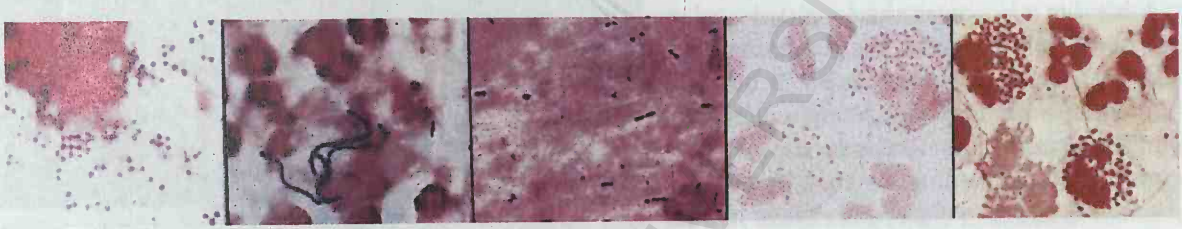


Fig. 57. De la stânga la dreapta: *S. aureus, Str. pyogenes, Str. pneumoniae, N. gonorrhoeae, N. meningitidis*, pe frotiuri colorate Gram din supuraţii cu coci piogeni (www.bact.wisc.edu/Bact303/pyogeniccocci.jpeg).

6.1. Coci Gram pozitivi, catalază-pozitivi, aerobi, de importanţă medicală

6.1.1. Genul *Staphylococcus* sp.

În manualul Bergey's, ediţia 1986, genul *Staphylococcus* este încadrat în familia *Micrococcaceae*, împreună cu genurile *Micrococcus*, *Planococcus* şi *Stomatococcus*.

Studiile la nivel molecular, bazate pe experimente de hibridizare şi stabilirea gradului de omologie a acizilor nucleici, la care s-a adăugat analiza altor proprietăţi (compoziţia chimică a peretelui celular) au demonstrat că genul *Micrococcus* este mai înrudit filogenetic cu actinomicetele, iar speciile aparţinând genului *Staphylococcus* sunt genetic mai asemănătoare cu lactococii, enterococii, lactobacilii, ca şi cu speciile genului *Bacillus*. Astfel, în ediţia 2004 a manualului Bergey, familia *Staphylococcaceae* este inclusă în Ordinul *Bacillales* (Buiuc şi Neguţ, 2008).

Aceste bacterii sunt larg răspândite în natură, fiind prezente în mediul acvatic, în sol şi în aer, dar şi în calitate de comensali pe tegument şi mucoase, la om şi animale.

Din familia *Micrococaceae*, bacteriile cele mai implicate în patologia umană sunt stafilococii, care determină un număr mare de entităţi clinice: supuraţii, abcese, o varietate de infecţii piogene (foliculite, furuncule, endocardite, osteomielite etc.) şi septicemii fatale.

Speciile de stafilococi cel mai frecvent izolate în clinică sunt *S. aureus, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. saprophyticus*. Stafilococii patogeni sunt adeseori hemolitici, coagulează plasma şi produc o diversitate de enzime extracelulare şi toxine. Forma cea mai comună de intoxicaţie alimentară este produsă de o enterotoxină termostabilă secretată de *S. aureus*.

Celulele sunt sferice, cu un diametru de 0,8–1 µm, imobile, nesporulate, aşezate în aglomerări asemănătoare ciorchinelui de strugure. În mediu lichid se găsesc sub forma cocilor izolaţi, a diplococilor, tetradelor sau a lanţurilor. Se colorează intens Gram pozitiv (fig. 58). Este de remarcat că speciile genului *Peptostreptococcus* (anaerob) se aseamănă ca morfologie şi mod de grupare cu stafilococii.

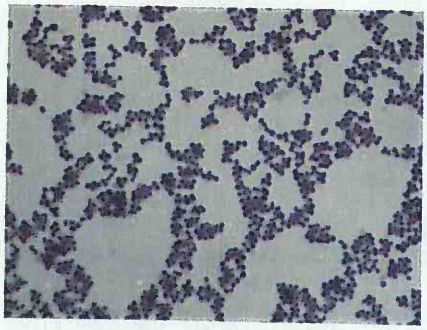


Fig. 58. Celule de *Staphylococcus* pe frotiul din cultură pură, colorat Gram (x 1500).

Celulele îmbătrânite tind să devină Gram negative. Stafilococii cresc pe majoritatea mediilor bacteriologice, în aerobioză şi microaerobioză, la 37°C şi fermentează glucidele. Cultura de *Staphylococcus* este o populaţie de celule heterogene ca dimensiuni, în ceea ce priveşte capacitatea de a sintetiza pigmenţi sau enzime, proprietăţile hemolitice, rezistenţa la medicamente şi virulenţa. Variabilitatea se datorează condiţiilor de mediu. La 25°C, majoritatea tulpinilor de stafilococ patogen sintetizează un pigment carotenoid galben-citrin (fig. 59). Acest pigment este produs de majoritatea tulpinilor de *S. aureus*, precum şi de *S. saprophyticus*. Stafilococii coagulazo-negativi formează pe mediu solid colonii albe, translucide (Howard and Kloos, 1987) (fig. 59).

S. aureus fermentează manitolul, în timp ce speciile de stafilococ coagulazo-negative (CNS) nu au această proprietate.

S. aureus subspecia *aureus* este agentul patogen major al infecţiilor dobândite în comunitate şi al celor nosocomiale. Denumirea speciei este dată de sinteza unui pigment auriu în condiţii favorabile de creştere. Multe colonii se pigmentează numai după o incubare prelungită. Pigmentul nu se sintetizează în bulion şi nici în anaerobioză. Unele tulpini de *S. aureus* nu produc pigment auriu, iar în condiţii nefavorabile de creştere, unele tulpini îşi pot pierde capacitatea de a produce hemolizina şi/sau coagulaza.

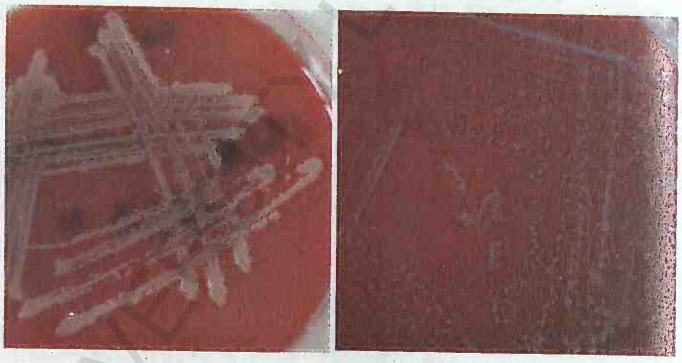


Fig. 59. Aspectul culturii de *S. aureus* producător de pigment auriu (stg.), şi al celei de *S. xylosus* (dr.) pe geloză sânge.

Stafilococii produc catalază (spre deosebire de streptococi), fermentează lent glucoza cu producere de acid, fără gaze. Speciile patogene secretă o mare diversitate de substanţe extracelulare.

Factori de virulenţă. Patogenitatea stafilococilor se datorează unui număr mare de factori de virulenţă (fig. 60), care conferă tulpinilor patogene proprietăţi noi fiziologice, metabolice şi de biosinteză: stafilococii au capacitatea de a se multiplica şi de a se disemina în ţesuturi; fac sinteza unui număr mare de tipuri de molecule toxice sau cu activitate enzimatică, codificate de gene plasmidiale sau cromosomale, conţin polizaharide şi proteine antigenice, stimulatoare ale sintezei anticorpilor opsonizanţi. Peptidoglicanul parietal este chemoatractant pentru PMN şi activează C.

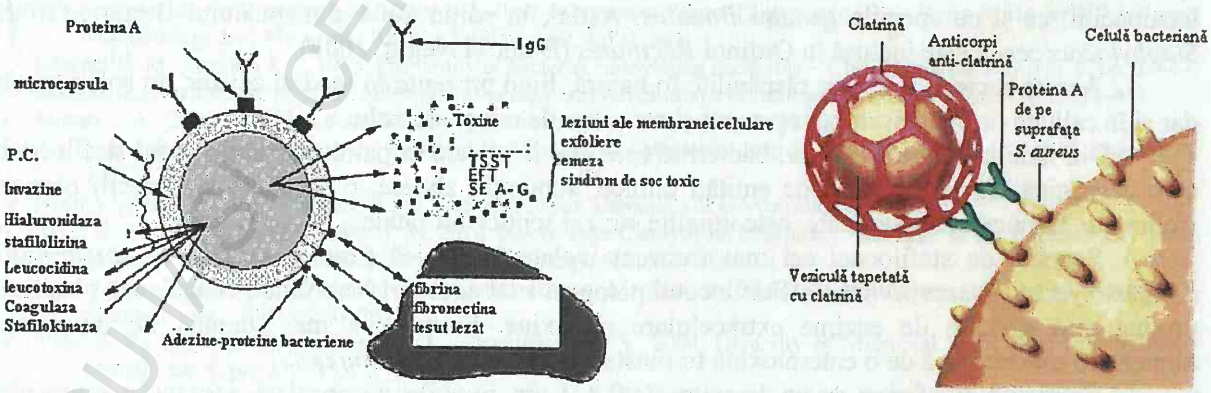


Fig. 60 a. Moleculele toxice şi enzimatice produse de *Staphylococcus* (după Todar, 2008). b. Utilizarea proteinei A de *S. aureus* în metodele de separare. O suspensie de vezicule membranare din mojaratul de ficat de şobolan se incubează în amestec cu Ac specifici anti-clatrină, proteina ce tapetează suprafaţa externă a unor vezicule citosolice. La amestec se adaugă o suspensie de celule de *S. aureus*, a cărei suprafaţă conţine proteina A, care leagă regiunea Fc a anticorpilor. Agregatele vezicule-bacterii se separă prin centrifugare la viteză mică (după Lodish, 5th Edition).

Factorii de virulență prezenți la Staphylococcus sp. sunt clasificați în mai multe categorii în funcție de: *particularitățile biochimice ce favorizează supraviețuirea în macrofage* (pigmentogeneza, producerea catalazei; fosfatază alcalină care determină scăderea pH în focarul de infecție); *mecanismele de evitare a răspunsului imun al gazdei* (proteina A; microcapsula, coagulazele libere și legate (*clumping factor*); *invazinele* (hialuronidaza este factor de invazie care acționează la începutul infecției, pentru că procesul inflamator inhibă acțiunea acestei enzime, stafilokinaza sau fibrinolizina, care acționează ca factor de difuzie, leucocidinele; proteazele; lipazele, ß-lactamazele); *exotoxinele* (α-toxina, β-toxina, leucocidina, toxinele exfoliative, toxina sindromului de șoc toxic, enterotoxine). Ingestia a 25 μgr de enterotoxină produce vomă și diaree.

Virulența este rezultatul unei combinații de factori extracelulari și toxici și a proprietăților invazive. Spectrul manifestărilor clinice este foarte diversificat: la un capăt al spectrului este *intoxicația alimentară* datorată ingestiei enterotoxinei preformate în alimentele contaminate; la cealaltă extremitate este *bacteriemia* stafilococică cu abcese diseminate în toate organele.

Tulpinile invazive produc coagulază, pigment și hemolizină. Cele neinvazive (*S. epidermidis*) nu produc coagulază și nici hemolizină, fiind implicate în producerea unor infecții asociate protezelor ortopedice, cardiovasculare sau la persoanele imunosupresate.

S. aureus cuprinde stafilococii coagulazo- pozitivi, patogeni pentru om și animale, de regulă hemolitici. Adeseori colonizează asimptomatic gazdele umane, cu statutul de comensal pe tegument și în cavitățile nazale. 20% dintre indivizii umani sunt colonizați persistent (pentru o perioadă lungă de timp), 60% sunt purtători intermitenți, iar 20% nu sunt colonizați. Purtătorii nazali de *S. aureus* joacă un rol cheie în dezvoltarea infecțiilor cu *S. aureus*. În primele două zile de viață, tegumentul nou-născuților este colonizat cu stafilococi (inclusiv *S. aureus*) de la persoanele de contact sau din mediu (Greenwood și colab., 1994). Vehicularea pe cale nazală la nou-născuți, cât și la persoanele mai în vârstă, este de obicei persistentă (timp de mai multe luni sau mai mulți ani). Alte situsuri de colonizare ale *S. aureus* pot fi: pliurile pielii, perineu, axile, vagin și tractul gastrointestinal. Deși este un membru frecvent al microbiotei normale, *S. aureus* este un patogen oportunist, ce produce un spectru larg de boli umane și animale. Factorii predispozanți pentru dezvoltarea acestor infecții sunt reprezentați de: (1) deficiențe de opsonizare (hipogamaglobulinemie), (2) leziuni ale pielii (arsuri, eczeme, incizii chirurgicale), (3) prezența de corpurilor străine (catetere intravenoase, dispozitive protetice), (4) infecții virale (gripa), (5) boli cronice (neoplazii, boli cardiace, SIDA, diabetul zaharat, alcoolism) și (6) injectarea intravenoasă a drogurilor.

S. aureus posedă cea mai largă varietate de mecanisme de virulență dintre toate microorganismele patogene pentru om și astfel reprezintă un model pentru studiul patogenezei bolilor infecțioase. Factorii de virulență (~ 70) sunt exprimați în mod coordonat în cursul diferitelor etape ale infecțiilor determinate (tabelele 8–9).

Tabelul 8.

Factorii de virulență și rolul lor în patogeneza infecțiilor cu *S. aureus* (adaptare după Peacock, 2002 și Archer, 1998).

Factori de virulență	Proprietăți	Rol în patogeneză
Adezine FnbpA și FnbpB ClfA și ClfB Fib Proteina A Bbp EbpS Cna Map/Eap	Ligand pentru fibronectină Ligand pentru fibrinogen Ligand pentru fibrinogen Ligand pentru domeniul Fc al IgG și vWF Ligand pentru sialoproteina osului Ligand pentru elastină Ligand pentru colagen Proteină analoagă CMH clasa II	Atașarea bacteriei la diferite componente ale celulelor eucariote și la membrana bazală a epiteliului
Toxine TSST-1 SEA ... SEJ Toxinele exfoliative ETA și ETB	Exotoxine cu activitate de superantigen	Manifestarea sindromului de șoc toxic; Inducerea stării toxice specifice Inducerea stării toxice specifice
Alfa-toxina Beta-toxina Gamma-toxina Delta-toxina PVL	Toxină citolitică, formatoare de pori, lizează eritrocitele de iepure Sfingomielinaza – determină liza cald – rece a eritrocitelor de oaie Leucocidină cu 2 componente Toxină citolitică, sinergia lizei dintre tulpina producătoare de beta-toxină și izolatul de testat pe geloză-sânge de oaie 3% Leucocidină cu 2 componente	Inducerea stării toxice specifice
Coagulaza	Leagă protrombina, activează conversia fibrinogenului la fibrină	

Exoenzime Proteaze Nucleaze Lipaze Hialuronat-liaza Stafilokinaza Colagenaza	Invazine care degradează componente structurale specifice din ţesuturile gazdei	Invazia ţesuturilor
Capsula/microcapsula Proteina A Coagulaza Enzime ce metabolizează acizii graşi Leucocidina şi/sau gamma-toxina		Evitarea mecanismelor de apărare ale organismului gazdă infectat

Cu excepţia sindroamelor toxemice, care sunt datorate producerii de superantigene (fig. 60a), patogeneza *S. aureus* este rezultatul acţiunii combinate a diferiţilor factori de virulenţă asociaţi celulei bacteriene şi extracelulari. Proteinele extracelulare aparţin unuia dintre următoarele tipuri: *receptine, toxine* şi *enzime*.

Principalele etape ale patogenezei infecţiilor cu *S. aureus* sunt: (1) colonizarea, (2) internalizarea, (3) invazia şi diseminarea sistemică şi (4) toxigeneza.

Colonizarea

Aderenţa *S. aureus* la celulele eucariote şi la dispozitivele medicale implantate reprezintă o etapă importantă în iniţierea infecţiei stafilococice. Adezinele mediază colonizarea şi condiţionează persistenţa *S. aureus* in diferite situsuri ale organismului uman. Capacitatea *S. aureus* de a adera la proteinele plasmatice şi la proteinele matricei extracelulare depozitate pe biomateriale este un factor important în patogeneza infecţiilor asociate cu dispozitivele medicale (L.G. Harris, 2002). Aderenţa este mediată de două tipuri de adezine, numite şi receptine (Kronwall & Johnsson, 1999). Din primul grup fac parte moleculele MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), cunoscute şi sub denumirea de *receptine asociate suprafeţei celulare.* Adezinele MSCRAMMs sunt ataşate covalent la peptidoglicanul peretelui celular, iar liganzii pot fi reprezentaţi de molecule de elastină, colagen, laminină, fibrinogen, fibronectină. Din familia de adezine MSCRAMMs fac parte*: (1) proteina A, (2) proteinele de legare a fibronectinei (FnBPs: FnbpA şi FnbpB), (3) factorii clumping ClfA şi ClfB, (4) proteina de legare a colagenului şi (5) proteina de legare a sialoproteinei osului (Bpb)*

Adezinele din cel de-al doilea grup sunt cunoscute sub denumirea de *receptine secretate* sau *molecule de aderenţă secretate* (*Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules* - SERAMs), şi sunt ancorate necovalent la suprafaţa celulei gazdă. Din această familie fac parte: *proteina extracelulară de legare a fibrinogenului* (*extracellular fibrinogen binding protein*, *Efb*), *Eap* (*extracellular adherence protein*), *Emp* (*extracellular matrix binding protein*) şi *coagulaza.*

Proteina A (Spa) este o proteină majoră a suprafeţei celulare, fiind prezentă la majoritatea tulpinilor de *S. aureus*. Manifestă o specificitate crescută de legare la domeniul Fc al IgG (subclasele 1, 2, 4, adică 95% din IgG total), cu rol în evitarea fagocitozei. De asemenea, proteina A leagă factorul von Willebrand (vWF), precum şi proteina gC_1qR, prezentă pe suprafaţa trombocitelor aderate, cu rol în patogeneza bolilor endovasculare stafilococice.

Reactivitatea extractului celular de S. aureus cu toate serurile umane s-a atribuit iniţial imunităţii specifice înnăscute antistafilococ. Ulterior s-a evidenţiat că proteina A se leagă nespecific cu fragmentul Fc al IgG umană. Proteina A nativă este un polipeptid cu 5 domenii, fiecare cu circa 60 de aminoacizi. Forma solubilă a proteinei A, eliberată prin digestia peptidoglicanului cu lizostafin (o endopeptidază stafilococică) se leagă cu regiunea Fc a IgG prin oricare dintre cele 5 domenii.

In vitro, proteina A are proprietăţi mitogene faţă de celulele T şi este super-Ag pentru limfocitele B.

Proteina A este un reactiv important în studiile imunologice. Imobilizată de sepharoză sau de alte suporturi, proteina A este un ligand de afinitate pentru IgG. Toate speciile de mamifere au IgG cu afinitate pentru proteina A.

Proteina A este un imunosorbent. Pentru prepararea imunosorbentului, celulele de S. aureus ce exprimă proteina A se fixează cu formol şi se omoară prin tratament termic. Proteina A rămâne legată de peretele celular şi funcţională pentru legarea Fc. Celulele astfel tratate şi adăugate la o soluţie de Ac, adsorb rapid Ac şi CI. Legarea este suficient de stabilă şi rezistă spălărilor repetate şi

centrifugării. Astfel, celulele de S. aureus fixate cu formol sunt ideale pentru captarea Ac şi a complexelor Ag-Ac. Deoarece proteina A este un reactiv eficient de legare pentru majoritatea anticorpilor IgG, orice alt complex preformat care conţine IgG va determina aglutinarea reactivului de Staphylococcus.

Selectivitatea înaltă a proteinei A pentru regiunea Fc a anticorpilor din complexele imune, a condus la folosirea proteinei A în locul anticorpilor secundari în multe tehnici imunologice. Proteina A este foarte utilă în metodele de testare a supernatantelor de hibridoma pentru prezenţa AMC.

Stafilococul tapetat cu anticorpi devine reactiv indicator pentru a detecta prezenţa Ag corespunzătoare specificităţii Ac cuplaţi.

Tehnica de coaglutinare s-a folosit pentru a detecta prezenţa Ag bacteriene în LCR sau în urină. Este utilă pentru identificarea imunologică a bacteriilor din cultură, cu reactivi comerciali, pentru gruparea streptococilor etc.

Proteinele de legare a fibronectinei – FnBPs (fibronectin binding proteins), sunt localizate la suprafaţa celulei bacteriene, fiind exprimate numai în faza exponenţială foarte timpurie de creştere. Toate tulpinile de *S. aureus* izolate din clinică posedă cel puţin una din cele două FnBPs (FnbpA, FnbpB). FnbpA mediază aderenţa la valvele lezate ale inimii şi promovează internalizarea *S. aureus* în celulele epiteliale.

Factorii clumping (ClfA şi B) sunt *receptine asociate suprafeţei celulei bacteriene* cu rol de adezine principale, care mediază legarea *S. aureus* la fibrinogen, tapetează rapid suprafeţele biomaterialelor implantate şi astfel contribuie la ataşarea *S. aureus* la aceste implanturi.

Proteina de legare a colagenului este importantă în patogeneza infecţiilor musculoscheletale (artrită septică, osteomielită). Strategiile terapeutice care au ca scop inhibiţia legării colagenului ar putea fi utile în prevenirea şi tratamentul infecţiilor musculoscheletale.

Proteina de legare a sialoproteinei osoase (Bpb) este implicată în patogeneza infecţiilor osoase (osteomielită) şi articulare (artrită septică).

Proteina de legare a elastinei (EbpS) facilitează colonizarea de către *S. aureus* a ţesuturilor lezate bogate în elastină (plămâni, piele).

Receptine secretate. Proteina extracelulară de legare a fibrinogenului (Efb) (anterior denumită Fib) este produsă în mod constitutiv de tulpinile de *S. aureus* în cursul fazei postexponenţiale de creştere, fiind secretată în mediu. Inhibă specific agregarea plachetară şi leagă fragmentul C3b, inhibând astfel activarea căilor clasice şi alternative ale complementului.

Coagulaza este secretată de către majoritatea tulpinilor patogene de *S. aureus*, fiind o receptină bifuncţională: leagă fibrinogenul şi coagulează plasma, cu formarea cheagului de fibrină. Coagulaza nu este o enzimă, ci o proteină extracelulară (forma liberă), ce se leagă la protrombina gazdei pentru a forma complexul reactiv echimolar stafilotrombina. Activitatea protează caracteristică trombinei este activată în acest complex şi are ca rezultat conversia fibrinogenului la fibrină, ceea ce duce la formarea cheagului de fibrină, produsul final al coagulării. O mică proporţie a coagulazei se găseşte sub formă legată pe suprafaţa celulelor bacteriene (factorul *clumping*) unde poate reacţiona cu protrombina. Coagulaza produce coagularea plasmei recoltată cu oxalat sau citrat, prin legarea de protrombină. Sinteza coagulazei este un factor de virulenţă şi conferă potenţial invaziv. Factorul de aderenţă (*clumping factor*) este diferit de coagulază şi determină depunerea fibrinei pe suprafaţa stafilococului, modificând rata ingestiei de către fagocite. Coagulaza liberă are rol în blocarea accesului factorilor bactericizi din plasma extravazată şi a leucocitelor la locul agresiunii stafilococice în exudatul inflamator.

S. aureus posedă o receptină secretată multifuncţională cunoscută sub mai multe denumiri: *proteina extracelulară de aderenţă (Eap)* sau *molecula analogă cu CMH clasa II (Map)*, sau *p70*. Adezina Eap are capacitatea de se lega la o varietate de proteine ale matricei extracelulare, precum şi la proteinele plasmatice: fibronectina, fibrinogenul şi protrombina. De asemenea, Eap poate forma oligomeri şi ulterior se poate lega la câteva structuri de pe suprafaţa *S. aureus*, mediind astfel, atât aderenţa *S. aureus* la dispozitivele protetice tapetate cu proteine gazdă, cât şi agregarea intercelulară a *S. aureus*. Această adezină are câteva roluri importante în patogeneza infecţiilor cu *S. aureus*: (1) are rol în internalizarea *S. aureus* în celule epiteliale şi fibroblaste; (2) modulează răspunsul imun prin inhibiţia recrutării neutrofilelor şi a răspunsului de hipersensibilitate întârziată; (3) interferă cu funcţia

celulelor T, conducând la boli cronice ca artrita sau osteomielita. O funcție nouă, recent descrisă pentru această adezină este cea de potențial inhibitor al angiogenezei.

Polizaharide extracelulare

Celulele prezintă *fimbrii* și o *microcapsulă* ce poate fi evidențiată la celulele din culturi de patru ore în bulion nutritiv, prin tehnica colorației negative cu tuș de India. Microorganismele implicate în infecții invazive, produc de regulă polizaharide capsulare extracelulare, cunoscute sub denumirea de *capsulă, slime* sau *glicocalix*. Termenul *slime* este de obicei utilizat pentru a desemna exopolizaharidele strâns asociate celulei bacteriene, care măresc vâscozitatea mediului de cultură lichid însămînțat cu tulpina care posedă acest factor de virulență. Producerea *slime* este implicată în aderență și în colonizarea dispozitivelor medicale.

Capsula este un factor major al virulenței bacteriene, cu rol antifagocitar. Majoritatea tulpinilor de *S. aureus* izolate din clinică (peste 90%) prezintă la exteriorul peretelui celular o capsulă polizaharidică. Tulpinile cu capsulă propriu-zisă produc *colonii mucoide* (tulpini M) și sunt rezistente la fagocitoză. Majoritatea izolatelor produc colonii nemucoide pe mediul agarizat și au microcapsulă (O'Riordan și colab., 2004). Capsula sau microcapsula conțin acid hexozaminuronic și împiedică interacția anticorpilor antiparietali cu receptorii suprafeței fagocitelor. În infecțiile experimentale pe șoarece, tulpinile mucoide injectate intra-abdominal nu sunt fagocitate, se multiplică, produc toxina α și moartea survine în 24-48 de ore.

Polizaharidele capsulei, în stare purificată, sunt slab imunogene pentru om și animale dar au proprietăți imunomodulatoare. Ele sunt antigene T-independente, dar după cuplarea cu o proteină *carrier* devin imunogene și antigene T-dependente. Conjugatele polizaharide-proteine induc sinteza anticorpilor anti-polizaharidici la titru înalt, iar rapelurile cresc titrul acestor anticorpi.

Internalizarea

Capacitatea *S. aureus* de a evita mecanismele imunității umorale ale gazdei prin internalizare și supraviețuire intracelulară reprezintă a doua etapă a infecției, ce conduce la persistența bacteriei pe termen lung. Infecțiile cu *S. aureus* reapar în pofida tratamentului corespunzător cu antibiotice. O asemenea persistență rămâne frecvent neexplicată. O posibilă cauză poate fi capacitatea *S. aureus* de a supraviețui în interiorul celulelor gazdă.

S. aureus este cunoscut în principal ca un patogen extracelular, dar s-a observat că, *in vitro,* poate invada o varietate de fagocite neprofesioniste: celule epiteliale, fibroblaste, osteoblaste și celule endoteliale. Astfel, *S. aureus* este internalizat, invadează fagocitele neprofesioniste printr-un mecanism ce necesită interacția specifică între anumite adezine (FnBPs, Eap) și celulele gazdă, ulterior are loc procesul de transducție a semnalului în celulele gazdă prin proteina tirozin-kinază, au loc rearanjamente ale citoscheletului și preluarea bacteriei în endosom. *S. aureus* are capacitatea de a scăpa din endosom, de a se multiplica și supraviețui în citoplasma celulei gazdă. Totuși, nu se cunoaște mecanismul prin care membrana endosomului este lezată. *S. aureus* internalizat în linii de celule epiteliale pulmonare are capacitatea de a se multiplica; această caracteristică având un rol important în frecvența și persistența infecțiilor invazive. *S. aureus* internalizat poate persista, scăpând mecanismelor de apărare a gazdei, sau se multiplică și ulterior se disemineză.

Procesul internalizării este urmat de modificări profunde în metabolismul celulelor endoteliale, incluzând sinteza IL-1, IL-6 și IL-8 și a moleculelor de aderență celulară – ICAM-1 și VCAM-1.

Invazia și diseminarea sistemică

În primele ore după infecție, stafilococii sunt îndepărtați din circulația sangvină, în parte datorită fagocitozei, dar și prin aderarea bacteriilor la țesuturile gazdei. Stafilococii care scapă procesului de fagocitoză se multiplică în țesuturile infectate și generează răspunsuri proinflamatorii mediate de citokinele și chemokinele eliberate de către macrofage, neutrofile și alte celule imunitare. Migrarea masivă a leucocitelor la situsul infecției este însoțită de necroză și de formarea unui strat de fibrină la periferia leziunii pentru a preveni diseminarea microbiană și a permite îndepărtarea resturilor de țesut necrotic. Activarea timpurie a răspunsului imun înnăscut limitează extinderea focarelor de infecție și scade severitatea infecțiilor stafilococice. Stafilococii ajunși în circulație pot adera prin mecanisme mediate de MSCRAMMs, la celulele endoteliului. După endocitarea de către celulele endoteliale, bacteriile elaborează enzime proteolitice care facilitează răspândirea către țesuturile

adiacente. Factorul tisular este exprimat de către celulele endoteliale, facilitând depozitarea fibrinei şi formarea de vegetaţii. După endocitarea stafilococilor, celulele endoteliale activate exprimă receptori Fc şi molecule de aderenţă VCAM şi ICAM şi eliberează IL-1, IL-6 şi IL-8, cu efect chimiotactic pozitiv pentru leucocite care migrează prin diapedeză la nivelul leziunii endoteliale. Atât macrofagele tisulare, cât şi monocitele circulante eliberează IL-1, IL-6, IL-8 şi TNF-α după expunerea la stafilococi. Citokinele eliberate în circulaţie de către monocite sau macrofage, precum şi de către celulele endoteliale, contribuie la instalarea sindromului septic şi a vasculitei asociate cu boala stafilococică sistemică.

Invazinele

S. aureus secretă o serie de proteine extracelulare, denumite invazine (proteaze, lipaze, nucleaze, colagenaze, coagulază, stafilokinază, hialuronidază) cu rol în degradarea componentelor tisulare şi în invazie (fig. 61). Coagulaza şi stafilokinaza sunt două receptine secretate, care frecvent sunt considerate exoenzime, dar nu sunt enzime adevărate, ci receptine, deoarece se leagă şi activează enzimele gazdă prin formarea de complexe cu acestea.

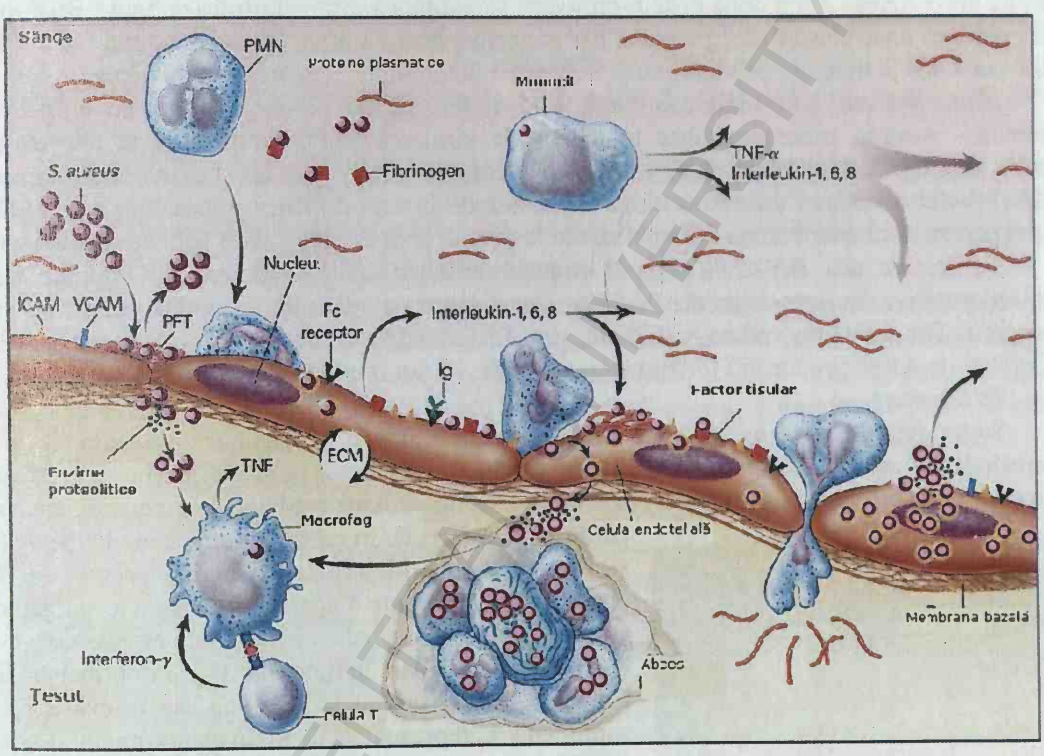


Fig. 61. Patogeneza invaziei tisulare a stafilococilor. Secvenţa evenimentelor progresează din partea stângă către cea dreaptă (după Lowy, 1997).

Stafilokinaza (Sak) facilitează legarea *S. aureus* la plasminogenul gazdă prin receptorii de pe suprafaţa celulei bacteriene şi astfel promovează invazia ţesuturilor gazdă. Asemănător coagulazei, stafilokinaza formează un complex echimolar cu plasminogenul. În acest complex, plasminogenul este activat cu formarea plasminei. Plasmina activată este o serin-protează cu spectru larg care degradează cheagurile de fibrină şi proteinele complexului matricei extracelulare (ECM), cu excepţia colagenului. Plasmina poate activa procolagenazele latente şi alte enzime proteolitice, care împreună cu plasmina determină degradarea colagenului şi a proteinelor ECM. În cursul infecţiei, Sak determină eliberarea stafilococilor prinşi în cheagurile de fibrină, fiind un factor de difuzie ce favorizează diseminarea bacteriilor în organismul gazdei. De asemenea, Sak formează un complex cu α-defensinele şi induce eliberarea de către polimorfonucleare a α-defensinelor. Producerea stafilokinazei conduce la neutralizarea α-defensinelor gazdei. α-defensinele sunt peptide bactericide ce furnizează protecţie faţă de infecţiile bacteriene prin distrugerea integrităţii pereţilor bacterieni.

Exoenzime/Exoproteine/proteine extracelulare sunt factori de virulență secundari, a căror funcție principală este de a converti țesuturile gazdă locale în nutrienți necesari pentru creșterea stafilococilor. Exoenzimele sunt prezente atât la *S. aureus*, cât și la stafilolococii coagulazo-negativi: *S. epidermidis* și *S. lugdunensis*. Deși unele toxine (hemolizinele) sunt în mod evident enzime, acestea nu sunt grupate împreună cu exoenzimele stafilococice (lipaze, lecitinaze proteaze, nucleaze, hialuronidaza și colagenaza).

Lipazele și *lecitinazele* sunt enzime implicate în patogeneza tulpinilor de *S. aureus* prin capacitatea lor de a induce formarea porilor în membrana celulelor eucariote, prin alterarea conținutului lipidic al acestora. Astfel, aceste enzime acționează asupra lipidelor plasmatice și tegumentare, ceea ce explică tropismul și colonizarea de către stafilococi a tegumentelor în zonele cu glande sebacee. De asemenea, lipazele au capacitatea de a inactiva lipidele bactericide.

Proteazele sunt enzime extracelulare cu specificitate scăzută, care hidrolizează proteinele la peptide și aminoacizi, fiind implicate în distrugerea țesuturilor gazdei. *S. aureus* produce patru proteaze extracelulare majore: serin-proteaza stafilococică (proteaza V8 sau SspA), o metaloprotează denumită aureolizină (Aur), două cistein-proteaze: staphopaina (Scp) și proteaza SspB. Serin-proteaza V8 degradează toate clasele de Ig umane, dar și unele adezine stafilococice, sugerând faptul că aceste enzime participă la tranziția celulelor de *S. aureus* de la fenotipul adeziv la unul invaziv.

Hialuronidaza, sau hialuronat-liaza, este sintetizată de *S. aureus*, dar nu și de către *S. epidermidis*. Această exoenzimă este un factor de virulență mai important decât alte exoenzime, deoarece distruge acidul hialuronic, unul dintre componentele centrale ale matricei extracelulare, facilitând astfel invadarea țesuturilor. Este un factor de invazie/difuziune, ce acționează la începutul infecției pentru că ulterior reacția inflamatorie de la nivelul țesutului blochează acțiunea acestei enzime.

Nucleazele sau *DN-azele* – sunt enzime termorezistente elaborate de tulpinile patogene coagulazo-pozitive în proporție de 90-95%, dar lipsesc la tulpinile coagulazo-negative și la *S. epidermidis*. Din punct de vedere biochimic, sunt fosfodiesteraze care pot hidroliza atât molecula de ADN, cât și de ARN, producând fosfomononucleotide, ce pot fi utilizate în sintezele bacteriene.

Toxigeneza

Supraviețuirea *S. aureus* în cursul infecției depinde de capacitatea acestuia de a depăși mecanismele de apărare ale gazdei. *S. aureus* produce o varietate largă de toxine și proteine, care inactivează celulele sistemului imunitar prin eliberarea de citokine mediată de superantigene, sau prin citotoxicitate directă, în cazul acțiunii hemolizinelor (Bhatia și Zahoor, 2007). Majoritatea tulpinilor secretă un grup de citotoxine care include 4 hemolizine distincte antigenic (α, ß, γ și δ). Funcția principală a hemolizinelor este de a converti componentele țisulare în nutrienți disponibili metabolismului bacterian. Unele tulpini produc una sau câteva exoproteine suplimentare, reprezentate de toxina sindromului de șoc toxic (TSST-1), enterotoxinele stafilococice (SEA...SEE și SEG...SEQ), toxinele exfoliative (ETA, ETB) și leucocidina Panton-Valentine. Funcția principală a toxinelor este de a inhiba răspunsul imun al gazdei față de *S. aureus*, dar fiecare toxină exercită și funcții biologice specifice, responsabile de manifestări clinice particulare.

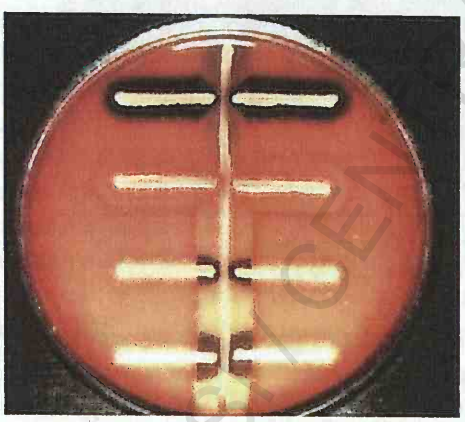


Fig. 62. Aspectul hemolizei sinergice produse de diferite tulpini de *S. aureus*. Vertical: *S. aureus* producător de β-hemolizină; orizontal: *S.aureus* producător de α-hemolizină; *S.aureus* producător de β-hemolizină; *S.aureus* producător de δ-hemolizină; *S. haemolyticus* producător de δ- hemolizină http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16.

Hemolizine

Hemolizinele sunt citotoxine cu efect citopatic și citolitic pentru o diversitate de celule: eritrocite, leucocite, macrofage, hepatocite, limfocite, limfoblaste, fibroblaste, neutrofile și plachete (fig. 62). Tulpinile de stafilococi patogene pentru om prezintă cel mai frecvent asociația de α și δ hemolizine (82%).

α-hemolizina (α – toxina) are acțiune litică asupra eritrocitelor de berbec și de iepure, foarte slabă asupra hematiilor umane, dar este foarte agresivă față de toate

țesuturile, inclusiv față de macrofage și trombocite. Monocitele sunt rezistente la acțiunea α-hemolizinei. Efectele se datorează, în mare parte, formării porilor cu diametrul de 1–2 nm, ce conduc la alterarea balanței ionice a celulei. Efectul final asupra gazdei este edemul pulmonar sau sindromul de detresă respiratorie. Un alt mecanism prin care α-toxina poate conduce la edem este contracția celulelor endoteliale determinată de pierderea ATP, împreună cu influxul de calciu. În final, fluxul de calciu activează nucleazele celulare, conducând la moartea apoptotică a celulelor. Are acțiune citotoxică selectivă asupra celulelor musculare netede din pereții vaselor de sânge conducând la vasoconstricție și ulterior la ischemie și necroză tisulară. În plus, α-toxina își exercită efectul asupra plachetelor sangvine putând conduce la eliberarea factorilor procoagulării prin influxul ionilor de calciu. α-toxina este dermonecrotică și neurotoxică, determinând distrugerea tecii de mielină. Un alt efect al α-toxinei este acela de a promova aderența neutrofilelor la celulele endoteliale în reacția inflamatorie timpurie. Toxinele formatoare de pori (alfa și gamma-hemolizina) determină eliberarea de mediatori inflamatori, cum ar fi fosfolipaza A2, prostaglandina I2, factorul de activare a plachetelor, leucotriena B4 și oxidul nitric. Toți acești mediatori pot contribui la debutul final al artritei septice.

β-hemolizina (β-toxina) este hemolitică pentru eritrocitele de berbec, dar nu și pentru cele de iepure și umane. Este o sfingomielinază C, a cărei activitate este intensificată prin incubarea la + 4°C, după tratamentul timp de 18–20 ore la 37°C, de unde rezultă denumirea de hemoliză cald-rece. Sensibilitatea diferită a eritrocitelor la β-hemolizină poate fi explicată prin conținutul diferit în sfingomielină al eritrocitelor mamaliene.

γ-hemolizina și *leucocidina Panton-Valentine (PVL)* aparțin familiei de toxine sinergohimenotropice, care lezează membrana celulelor gazdă prin acțiunea sinergică a două tipuri de proteine.

PVL este prezentă la tulpinile de *S. aureus* comunitare, fiind asociată cu leziuni necrotice ale pielii sau mucoaselor și cu pneumonia hemoragică severă necrotică.

δ-hemolizina (δ-toxina, δ-lizina) determină lezarea membranei celulare a eritrocitelor umane, de berbec, de iepure, precum și a diferitelor structuri subcelulare: organite legate de membrană, sferoplaști, protoplaști. De asemenea are acțiune citolitică asupra neutrofilelor, limfocitelor, trombocitelor și macrofagelor. Circa 97% dintre tulpinile de *S. aureus* produc această toxină citolitică, a cărei sinteză este controlată de sistemul de *quorum sensing*. Are activitate dermonecrotică.

Superantigene – toxine pirogenice

Toxina sindromului de șoc toxic (TSST-1) și *enterotoxinele stafilococice (SEs)* sunt superantigene pirogenice – PTSAgs (*pyrogenic toxin superantigens*) înrudite structural, cu proprietăți toxice specifice, pirogene, superantigenice și sensibilitate la șocul endotoxic.

Calitatea de superantigen a toxinelor constă în capacitatea de a stimula nespecific proliferarea limfocitelor T prin legarea la o regiune specifică variabilă a lanțului β a (receptorului T celular) RCT (fig. 63). Consecutiv legării are loc eliberarea masivă a citokinelor proinflamatorii, caracteristice pentru un răspuns de tip Th1: TNF-α, IL-6 și IFN-γ, mediatoare ale patofiziologiei sindromului de șoc toxic stafilococic (STSS).

TSST-1 este un superantigen produs de anumite tulpini de *S. aureus*, precum și de anumite tulpini de *Str. pyogenes*. Toxina activează un număr mare de limfocite Th, se leagă direct de moleculele CMH II, fără a mai necesita internalizarea și prelucrarea, determinând activarea limfocitelor și eliberarea consecutivă a unor cantități mari de IL-2 și de IL-1 din macrofage.

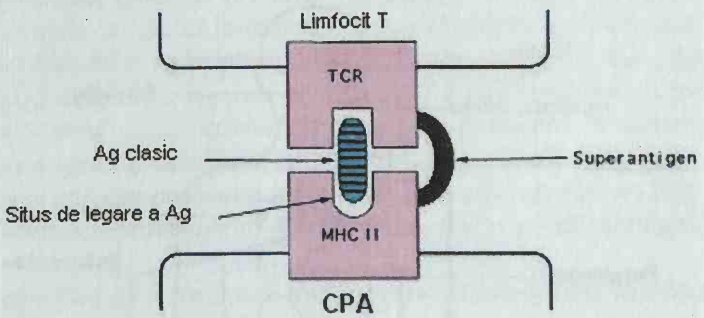


Fig. 63. Ilustrarea schematică a mecanismului molecular al acțiunii superantigenelor. Superantigenul stimulează nespecific un număr mare de clone de celule T, deoarece leagă încrucișat receptorul celulei T (RCT) și molecula CMH II a celulei care prezintă antigenul. Legarea superantigenului cu RCT și cu molecula CMH este nespecifică, în afara situsului de recunoaștere a antigenelor obișnuite. Celulele T activate eliberează citokine ce mediază starea de șoc și leziunile tisulare.

Enterotoxinele au activitate proteazică, sunt difuzibile şi manifestă tropism faţă de mucoasa intestinală, fiind cauza frecventă a intoxicaţiilor alimentare. Au fost identificate 17 enterotoxine stafilococice (SEA...SEE şi SEG...SEQ). Au calitate de superantigene, se leagă de moleculele CMH II şi induc stimularea policlonală a limfocitelor T şi manifestările de sindrom de şoc toxic; prezintă numeroase variante antigenice şi sunt produse de 50% dintre tulpinile de *S. aureus*, atunci când contaminează produse alimentare bogate în glucide şi proteine.

Toxinele exfoliative/epidermolitice A şi B (produse de tulpinile de *S. aureus* ce aparţin grupului fagic II) sunt superantigene asociate cu sindromul pielii opărite (sindromul Ritter) (Lina et al., 2007; King et al., 2009). Sindromul cuprinde trei entităţi clinice (necroliza epidermală toxică, eritemul scarlatiniform şi impetigo – bube dulci) şi se manifestă prin febră, eritem şi blistere, care se pot rupe cu formarea unei zone dure de culoare roşie. Uneori copiii afectaţi prezintă o secreţie conjunctivală mucopurulentă.

Particularităţi fiziologice. Culturile cresc în *aerobioză*, stafilococii fiind facultativ *anaerobi*. Sinteza toxinelor este favorizată de creşterea în atmosferă de CO_2, 5–10%. Temperatura optimă de dezvoltare variază între 30–37°C, pH optim 7–7,5. Incubate timp de 16-18 ore, culturile în mediu lichid tulbură uniform mediul, iar culturile pe mediu solidificat se caracterizează prin apariţia coloniilor circulare (diametrul de 1 mm), bombate, opace, cu o consistenţă cremoasă, cu margini regulate, suprafaţa netedă, lucioasă, pigmentate în galben citrin. Cercetarea pigmentogenezei se face prin cultivare în prezenţa serului bovin coagulat, incubare timp de 27 de ore la 37°C şi apoi 24 ore la 25°C, la lumina zilei. Producerea coagulazei este importantă pentru identificare, iar producerea *catalazei* este importantă pentru diferenţierea de *Streptococcus* sp.

Rezistenţa la factori fizico-chimici. Stafilococii rezistă la uscăciune timp de săptămâni şi chiar luni în produse biologice uscate (puroi, spută), dar şi în praful de cameră şi chiar în nisipul plajelor. Sunt distruşi prin expunere la 60°C, timp de 30 minute, în prezenţa fenolului 5%, timp de 10 min. şi a alcoolului etilic de 70°, timp de 1 oră. Tolerează până la 9% concentraţie NaCl. Sensibilitatea la medicamente este variabilă. Rezistenţa la penicilină (de exemplu, meticilina) este foarte frecventă printre tulpinile de *S.aureus*.

Structura antigenică. Tulpinile care produc infecţii invazive sintetizează material capsular şi devin astfel rezistente la fagocitoză. Acidul ribitol-teichoic, derivat al acidului teichoic, este principalul antigen polizaharidic care conferă specificitate de specie pentru *S. aureus,* iar acidul glicerol-teichoic este caracteristic speciei *S. epidermidis*. Diferenţierea serologică a stafilococilor nu este necesară, identificarea tulpinilor de *S. aureus* făcându-se prin tipizare fagică.

Patologia este foarte diversă (fig. 64) (tabelul 9).

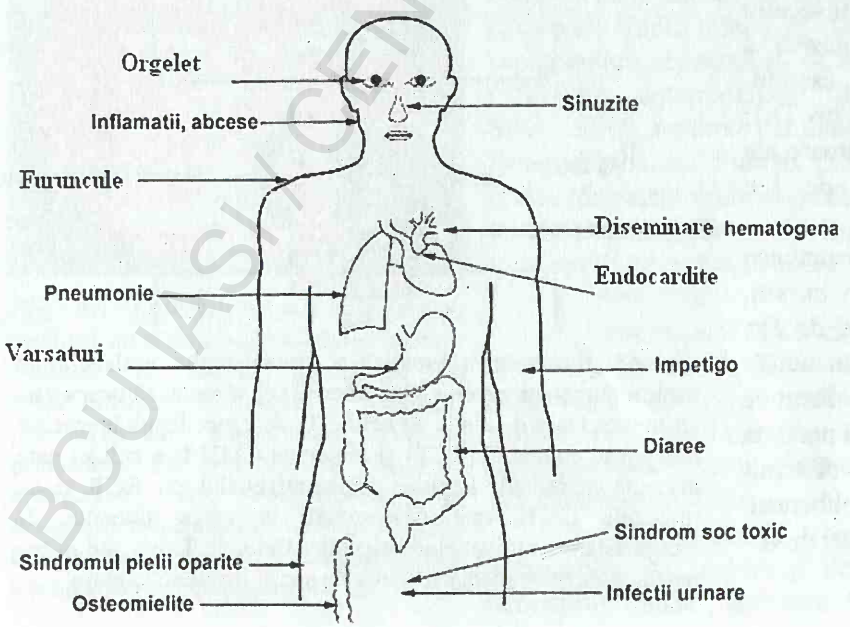


Fig. 64. Localizarea infecţiilor produse de *Staphylococcus* în organismul uman (după Todar, 2008).

Tabelul 9.

Principalele tipuri de infecţii determinate de *S. aureus* şi factorii de virulenţă implicaţi

Tipul de infecţie	Factori de colonizare	Invazine	Enzime extracelulare	Rezistenţa la fagocitoză	Eludarea efectorilor imunitari	Toxigeneza
Foliculite	Adezine	Stafilokinaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina	Coagulaza	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
Pneumonie		Stafilokinaza Hialuronidaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina Hemolizine Carotenoizi Superoxid-dismutaza Catalaza Creştere la pH scăzut	Coagulaza Variaţie antigenică	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
Toxiinfecţii alimentare						Enterotoxine A-G
Septicemie (invazia sistemului circulator)		Stafilokinaza Hialuronidaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina Hemolizine Carotenoizi Superoxiddismutaza Catalaza Creştere la pH scăzut Proteina A	Coagulaza Variaţie antigenică Proteina A	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
Osteomielite (invazia osului)	Adezine	Stafilokinaza Hialuronidaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina Hemolizine Carotenoizi Superoxiddismutaza Catalaza Creştere la pH scăzut Proteina A	Coagulaza Variaţie antigenică Proteina A	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
TSS (*toxic shock syndrome*)						Toxina TSST; enterotoxine A-G
Infecţii ale leziunilor chirurgicale	Adezine	Stafilokinaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina Hemolizine Carotenoizi Superoxiddismutaza Catalaza Creştere la pH scăzut Proteina A	Coagulaza Variaţie antigenică Proteina A	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
Sindromul pielii pătate (analog febrei scarlatinoase)	Adezine	Stafilokinaza		Coagulaza Leucocidina Hemolizine	Coagulaza Variaţie antigenică Proteina A	Toxine exfoliative

S. aureus produce cele mai multe dintre infecţiile nosocomiale. În funcţie de localizare, infecţiile stafilococice pot fi:

– la poarta de intrare – la nivelul tegumentului şi mucoaselor: stafilococii cu tropism pentru ţesutul cutanat aparţin grupului fagic 2 şi produc foliculite profunde (furuncul), foliculite ale genelor (orgelet sau urcior), în care infecţia se produce la nivelul foliculului, dar şi al glandei perifoliculare, acneea pustuloasă, hidrosadenita (infecţia glandelor sudoripare), impetigo, otite, conjunctivite, plăgi sau arsuri contaminate, infecţii ale tractului respirator superior şi inferior. Bacteriile elimină toxine codificate de plasmide care produc „sindromul pielii opărite" la copii, ca şi leziuni la distanţă, caracterizate prin distrugerea substanţei cimentante şi exfolierea epidermei;

– *enterocolita* pacienţilor spitalizaţi, mai ales postantibioterapie cu antibiotice de spectru larg;

– la nivelul *tractului genital* feminin pot determina infecţii ale trompelor uterine (salpingite), ovarite şi pelviperitonite;

– la nivelul aparatului *urinar*, staza urinară favorizează multiplicarea stafilococilor în vezica urinară şi infecţiile ascendente ale ureterelor şi rinichilor;

– tulpinile invazive pot produce osteomielită, septicemie, meningită, endocardită.

Stafilococii coagulazo-negativi (*S. epidermidis, S. saprophyticus*), componenţi ai microbiotei normale, produc infecţii asociate cu implanturile, la persoanele imunocompromise, la vârstnici şi infecţii ale tractului urinar la femeile tinere. Alte specii coagulazo-negative au importanţă majoră pentru patologia veterinară.

Infecţia stafilococică este intens inflamatorie, induce afluxul neutrofilelor şi în consecinţă, piogenă. *S. aureus* scapă acţiunii fagocitelor neutrofile şi, de la locul infecţiei primare, invadează

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

țesuturile. Creşterea frecvenței septicemiilor cu bacterii Gram pozitive se datorează capacității sale de a coloniza cateterele intravasculare şi materialele implantate chirurgical, precum şi rezistenței la meticilină. Antigenele inductoare ale inflamației sunt acizii lipoteichoici (ALT), peptidoglicanul parietal, toxinele secretate inductoare ale şocului septic, peptidele formil-metionil şi ADN bacterian. ADN bacterian are proprietăți proinflamatorii şi inițiază artrita. Inflamația este stimulată de citokinele secretate de monocite/macrofage: TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8. IL-8 este atractant puternic pentru neutrofile, iar MCP-1 (proteina-1 chemoatractantă macrofag/monocit) şi MIP-1 (proteina-1 inflamatorie a macrofagelor) sunt atractante pentru monocite la situsul inflamației.

Concentrația serică maximă a citokinelor induse de bacteriile Gram pozitive se realizează la 50–75 de ore, iar pentru cele Gram negative, la 1–5 ore de la infecție. TNF-α are rol determinant pentru evoluția procesului inflamator indus de bacteriile Gram negative, iar pentru bacteriile Gram pozitive, efectele TNF-α se produc în cooperare cu celelalte citokine proinflamatorii.

Fagocitele profesioniste (neutrofilele şi macrofagele) leagă antigenele de *S. aureus* (LTA) prin intermediul receptorului membranar TLR-2 (*Toll-like receptor*-2) (Fournier şi Philpott, 2005). Primul receptor al familiei Toll a fost identificat la *Drosophila melanogaster*, foarte rezistentă la infecțiile microbiene, deoarece sintetizează peptide antimicrobiene. Sinteza peptidelor este reglată de un receptor Toll, iar mutantele Toll$^-$ sunt sensibile la infecțiile fungice şi bacteriene. De aceea, Toll este un receptor esențial pentru recunoaşterea imună înnăscută la *D. melanogaster*.

Rezistența la antibiotice a tulpinilor de S. aureus

Rezistența la penicilinele stabile la penicilinaze a fost denumită în trecut rezistența la meticilină. În prezent se foloseşte termenul MRSA (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*) sau *S. aureus* rezistent la oxacilină. Stafilococii sensibili la penicilină sunt sensibili şi la alte peniciline, precum şi la cefalosporine, cefemi şi carbapenemi. Tulpinile rezistente la penicilină, dar sensibile la cefoxitin sunt rezistente la penicilinele sensibile la penicilinaze şi sensibile la penicilinele stabile la penicilinaze (oxacilină, meticilină, dicloxacilină, nafcilin), la cefeme şi carbapenemi, precum şi la combinațiile dintre un β-lactam şi un inhibitor al β-lactamazei. Circa 90% dintre tulpinile de *S. aureus* produc β-lactamază şi sunt rezistente la penicilină. Tulpinile rezistente la cefoxitin manifestă rezistență la toți β-lactamii. Astfel, sensibilitatea/rezistența unei tulpini de *S. aureus* la β-lactami poate fi dedusă prin testarea numai la cefoxitin şi penicilină.

Tulpinile MRSA prezintă o frecvență crescută în spitale şi în unitățile de îngrijire pe termen lung. Pot determina infecții grave, iar opțiunile de tratament sunt limitate.

Rezistența *S. aureus* la macrolide poate fi datorată efluxului activ (codificat de gena *msrA*), care conferă rezistență numai la macrolide şi la steptograminele de tip B, sau modificării țintei ribosomale când apare mecanismul de rezistență MLSB (*macrolide-lincosamide-streptogramin B*), asociat cu rezistența inductibilă sau constitutivă la agenții MLSB.

Tulpinile care prezintă o rezistență constitutivă la MLSB (MLSBc) manifestă *in vitro* rezistență la toți aceşti agenți. Rezistența MLSB inductibilă se instalează după expunerea la un macrolid. Tulpinile cu rezistență MLSB inductibilă (MLSBi) prezintă *in vitro* rezistență la membrii grupului de macrolide cu 14 şi 15atomi de C (de exemplu, eritromicina) şi sunt sensibile la macrolidele cu 16 atomi de C, la lincosamide şi la steptograminele de tip B.

Datorită prevalenței* tulpinilor rezistente la antibiotice şi emergenței recente a izolatelor clinice rezistente la vancomicină, controlul infecțiilor este tot mai dificil.

* *Prevalența* semnifică numărul total al persoanelor infectate, cazuri vechi şi noi, într-o populație la un anumit moment. *Incidența* semnifică numărul cazurilor noi de infecție care apar într-o anumită populație într-un interval definit.

S. epidermidis. Patogenitatea rezidă în proprietatea de aderență la dispozitive protetice utilizate în clinică, prin intermediul adezinelor polizaharidice şi a materialului mucos (*slime*) format din acid teichoic solubil.

S. epidermidis produce foliculită, pneumonie, toxiinfecții alimentare, septicemie, osteomielită, sindromul de şoc toxic, infecții ale plăgilor chirurgicale, sindromul pielii opărite, cu manifestări asemănătoare febrei scarlatinoase, infecții asociate dispozitivelor cardiovasculare şi ortopedice.

Infecțiile tegumentare apar în special la adolescenți (acnee, furuncule) și la pacienții tratați un interval de lungă durată cu corticosteroizi. Abcesele și alte leziuni supurative se tratează prin drenaj și terapie antimicrobiană.

S. saprophyticus este a doua cauză, după *E. coli,* a infecțiilor de tract urinar la femeia tânără.

Diagnosticul de laborator. Probele utilizate sunt puroiul, sângele, aspiratul traheal, LCR. Pe frotiuri se observă coci Gram pozitivi, dar *S. aureus* nu se distinge morfologic de *S. epidermidis*. Cultivarea pe mediu agarizat cu sânge generează colonii după 18 ore la 37°C. Hemoliza și pigmentația apar după câteva zile la temperatura camerei (fig. 65). *S. aureus* (dar nu și alte specii) fermentează *manitolul* (fig. 66). Probele se cultivă pe mediu cu 7,5% NaCl. În mediul salin crește numai *S. aureus*, celelalte microorganisme fiind inhibate.

Testul *catalazei* se folosește pentru a detecta prezența *citocrom-oxidazei*, enzimă caracteristică bacteriilor aerobe. Eliberarea O_2 semnifică testul pozitiv.

Testul *coagulazei* se realizează prin amestecul plăsmei de iepure sau al plasmei umane cu citrat, diluată 1:5, cu un volum egal cu cultură bacteriană dezvoltată în mediul lichid, incubat la 37°C. Reacția este pozitivă dacă coagularea se produce în 1-4 ore (fig. 67). Ca martor se folosește amestecul de plasmă cu bulionul steril. De asemenea, evidențierea coagulazei libere se poate realiza pe medii speciale (mediul Baird Parker sau mediul *Coagulase Mannitol*) (fig. 69–69).

Fig. 65. Tulpini de *S. aureus* β-hemolitice și α-hemolitice însămânțate în sector pe geloză- sânge.

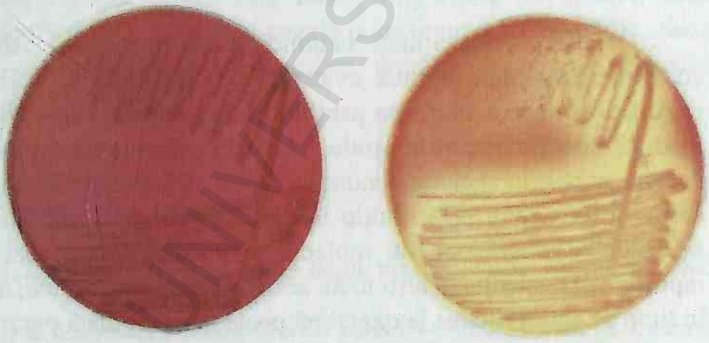


Fig. 66. Detectarea fermentării manitolului pe mediul Chapman (stânga –negativ, dreapta- pozitiv) la *S. aureus.*

Fig. 67. Testul coagulării plasmei de iepure

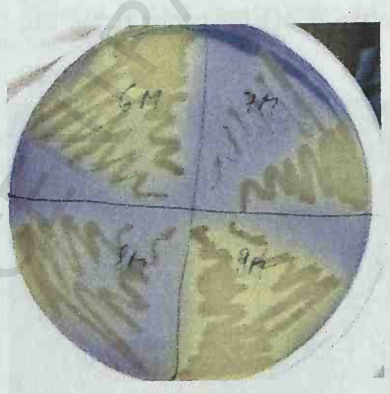


Fig. 68. Detectarea fermentării manitolului și a prezenței coagulazei libere pe mediul *mannitol-coagulase* la *S. aureus.*

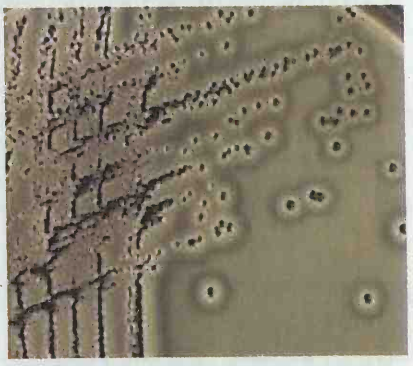


Fig. 69. Detectarea coagulazei libere pe mediul Baird Parker la *S. aureus.*

Detectarea coagulazei legate se poate realiza printr-un test rapid de aglutinare neimună, care constă în amestecul unei anse de cultură crescută pe mediu solid, cu o suspensie de particule de latex sau hematii sensibilizate cu fibrinogen. În prezența coagulazei parietale, fibrinogenul va fi transformat în fibrină insolubilă care va antrena particulele insolubile colorate, generând apariția unor grunji vizibili cu ochiul liber și clarificarea soluției.

Fig. 70. Testul producerii DN-azei pe mediu cu ADN şi albastru de toluidină.

Termonucleaza stafilococică se evidenţiază pe geloză cu ADN cu sau fără albastru de toluidină. În geloză se decupează godeuri, în care se depun 5 µl cultură de *S. aureus* crescută în mediu lichid şi inactivată termic prin menţinere pe baie de apă la 100°C timp de 30 minute, iar hidroliza ADN este revelată fie prin precipitarea ADN cu HCl 1N (reacţia pozitivă constă în apariţia unui halou în jurul godeului după câteva minute), sau dacă mediul conţine albastru de toluidină, se va observa un halou roz în jurul godeului, în timp ce restul mediului rămâne colorat în albastru (fig. 70). Identificarea biochimică a diferitelor specii de *Staphylococcus* se poate realiza şi cu ajurorul galeriilor miniaturizate API (fig. 71) sau cu ajutorul sistemelor automate de identificare.

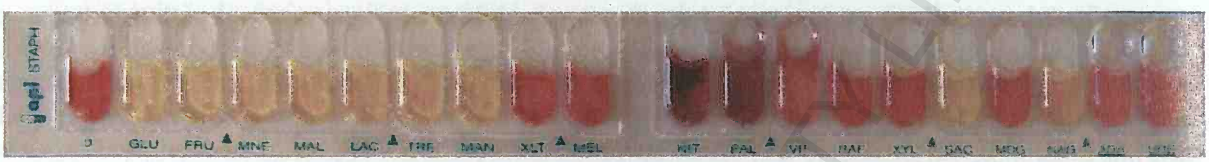


Fig. 71. Test API 20 STAPH caracteristic speciei *S. aureus.*

Testarea sensibilităţii la antibiotice se realizează sistematic pentru tulpinile izolate din infecţii cu simptomatologie clinică evidentă, pe mediu Müller Hinton. Rezistenţa la penicilină, mediată enzimatic se poate confirma prin testul cromogenic rapid (fig. 72), în timp ce rezistenţa la oxacilină, mediată neenzimatic, prin producerea unei proteine modificate care leagă penicilina (PBP2a) se poate detecta atât prin metode fenotipice (disc difuzimetrică, cu ajutorul discurilor de oxacilină sau de cefoxitin (fig. 74), prin diluţie în agar sau în mediu lichid a oxacilinei, prin E-test sau cu ajutorul mediilor cromogenice) sau moleculare (evidenţierea genei *mec*A). Rezistenţa la oxacilină implică raportarea rezistenţei pentru toate antibioticele β-lactamice, indiferent de rezultatele testării fenotipice, în timp ce sensibilitatea la oxacilină poate fi extrapolată pentru toate β-lactamicele.

Detectarea tulpinilor cu sensibilitate redusă la vancomicină necesită utilizarea unei metode cantitative care să permită stabilirea valorii CMI. De menţionat că doar tulpinile cu CMI ≥ 32µg/ml pot fi evidenţiate ca rezistente prin metoda clasică, disc difuzimetrică, în timp ce cele cu CMI <32µg/ml necestă o metodă cantitativă (CMI în mediu lichid sau E-test sau diluţie în agar) (CLSI, 2009, 2010) (fig. 73).

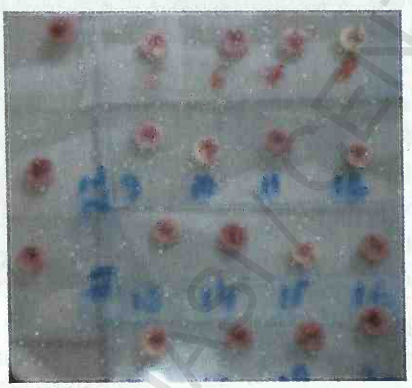


Fig. 72. Confirmarea producerii de penicilinază prin testul rapid de hidroliză a nitrocefinei cu generarea unui produs colorat în roşu.

Fig. 73. Testarea comparativă disc difuzimetrică şi prin E-test a sensibilităţii la vancomicină.

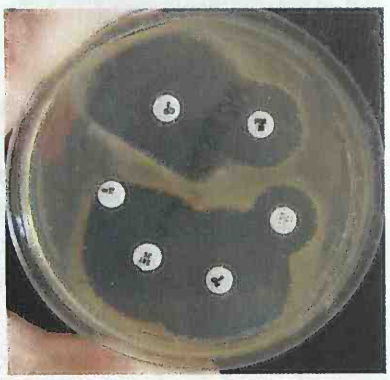


Fig. 74. Antibiograma de *S. aureus,* cu fenotip MLSb inductibil.

Tulpinile cu rezistenţă MLSB inductibilă (MLSBi) se evidenţiază prin plasarea alăturată a discurilor de eritromicină şi clindamicină. Apariţia unei zone de antagonism între cele două antibiotice indică fenotipul de rezistenţă inductibilă la lincosamide şi streptogramine B (fig. 74, 75).

Fig. 75. Tulpină de *S. aureus* cu fenotip de rezistență la meticilină, penicilină și MLSBi.

Epidemiologie. Sursele de infecție sunt leziunile umane, lenjeria contaminată, tractul respirator, tegumentul. Răspândirea prin contact direct este foarte importantă în spitale, unde personalul și pacienții sunt purtători de stafilococi în cavitățile nazale și pe tegument. În spitale, riscul major de infecție îl prezintă personalul de îngrijire a nou-născuților, unitățile de terapie intensivă, sălile de operație și de chimioterapie antineoplazică.

Bibliografie selectivă

Fournier B., Philpott D. J. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System – Clin. Microbiol. Rev. 18: 521–540.

Dinges, M. M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* – Clin. Microbiol. Rev., January 2000, 13: 16–34.

O'Riordan K., Lee J.C. 2004. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. Clin. Microbiol. Rev. 7: 218–234.

Bhakdi S., Tranum-Jensen J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Rev. 55(4): 733–751.

Brooks, G. F., Caroll, K. C. Butel J. S., Morse S. A. 2007. Jawetz, Melnick & Adelberg Medical Microbiology, 2007, 24th Edition, Mc Graw Hill – Lange International Edition.

Todd J. K. 1998. Toxic scock syndrome. Clin. Microbiol. Rev.: 432–446.

Buiuc D. și Neguț M. 2008. Tratat de Microbiologie medicală, ed. a II-a, Ed. medicală, București

Cotar A. 2010. Teză de doctorat – Implicațiile fenomenului de *quorum sensing and response* în exprimarea coordonată a factorilor de patogenitate și virulență la tulpini de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*

Archer G. L. 2001. *Staphylococcus aureus:* A Well-Armed Pathogen – Clinical Infectious Diseases. 26:1179–81.

Peacock S. J., de Silva, L., Lowy, F. D. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?Trends Microbiol. 9:605–610.

Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus infections*. N Engl J Med. 339:520–535.

Bhatia, A., Zahoor S. 2007. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research.1(2):188–197.

Lina G., Gillet Y., Vandenesch F., Jones M. E., Floret D., Etienne J. 1997. Toxin Involvement in Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. Clinical Infectious Diseases. 25:1369–73.

King, R. W., Saint Victor P. 2009. FACEP- Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. Updated Jun 18, 2009. www.bact.wisc.edu/Bact303/pyogeniccocci.jpeg

Todar, K. 2008.Todar's Online Textbook of Bacteriology- www.textbookofbacteriology.net

WHO. 2003. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, 2nd Edition WW.

Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol 29, no. 1

Clinical Laboratory Standards Institute. 2010. Surveillance for MRSA: principles, practices and challenges. A report. X07-R, vol. 30, no. 5

http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A:, Krieger M., Scott M. P., Zipursky L., Darnell J. Molecular Cell Biology. 5th Ed.

6.2. Coci Gram pozitivi, catalază-negativi, de importanţă medicală. Familia Streptococcaceae

Reuneşte coci sau cocobacili grupaţi în tetrade sau lanţuri, anaerobi, microaerofili sau facultativ anaerobi, Gram pozitivi, catalazo-negativi, care fac parte din microbiota normală a tractului digestiv la om şi animale, au rol important în industria alimentară, ca prezervanţi, datorită produşilor de metabolism al glucidelor homo- (acid lactic) sau heterofermentativ (acid lactic, acid acetic, CO_2). Pot produce infecţii la om (tabelul 10), sau o stare fiziopatologică de sensibilizare. Streptococii eliberează o varietate de substanţe extracelulare şi enzime.

Tabelul 10

Caracteristicile speciilor de streptococi de importanţă medicală (după Brooks şi colab., 2007).

Specia	Antigenul Lancefield specific de grup*	Tipul de hemoliză (pe geloză cu 5% sânge de berbec, după 24 de incubare)**	Habitat	Caractere de laborator utile în identificare	Implicaţiile în patologia umană
Str. pyogenes	A	β	Piele, faringe	Colonii mari (> 0.5 mm), PYR (L-pirolidonil-2-naftilamidă)-pozitiv, sensibilitate la bacitracină	Faringită, impetigo, febră reumatismală, glomerulonefrită
Str. agalactiae	B	β	Tractul genital feminin	Hidroliza hipuratului, CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson)-pozitive	Sepsis neonatal, meningită
Str. dysgalactiae subsp. *equisimilis*	C, G	β (cu implicaţii în patologia umană), α, γ	Faringe	Colonii mari (> 0.5 mm)	Faringită şi alte infecţii piogene similare celor produse de streptococii de grup A
Enterococcus faecalis (şi alţi enterococi)	D	Gama, alfa	Colon	Creşte în prezenţa sărurilor biliare, hidrolizează esculina, creşte în prezenţa de 6.5% NaCl, PYR-pozitiv	Abcese abdominale, ITU, endocardite
Str. bovis (non-*Enterococcus*)	D	Gama	Colon	Creşte în prezenţa sărurilor biliare, hidrolizează esculina, creşte în prezenţa de 6.5% NaCl, degradează amidonul	Endocardite, bacteriemii la pacienţii cu cancer de colon
Grupul *Str. anginosus* (*Str. anginosus*, *Str. intermedius*, *Str. constellatus*, grupul *Str. milleri*).	F (A, C, G) nontipabili	Alfa, beta, gama	Faringe, colon, tract genital feminin	Colonii mici (< 0.5 mm), cele de group A rezistente la bacitracină şi PYR-negative. Profiluri distincte de fermentare a zaharurilor	Infecţii piogene, inclusiv abcese cerebrale
Specii de streptococi viridans	Nontipabili	Alfa, gama	Cavitatea orală, faringe, colon, tract genital feminin	Rezistenţă la optochin, bilă. Profiluri distincte de fermentare a glucidelor	Cariogeneză (*Str. mutans*), endocardite, abcese polimicrobiene
Str. pneumoniae	–	Alfa	Faringe	Sensibil la optochin şi săruri biliare, reacţie pozitivă de umflare a capsulei	Pneumonie, meningită, endocardită
Specii de *Peptostreptococcus*	–	Gama, alfa	Cavitatea orală, faringe, colon, tractul genital feminin	Strict anaerobi	Abcese polimicrobiene

* Specificitatea serologică de grup a componentelor peretelui celular şi a altor antigene parietale sau capsulare a stat la baza schemei de clasificare a lui Lancefield (1936). Gruparea serologică în grupele Lancefield A-H şi K-U se face pe baza specificităţii antigenice a unui glucid aminat. Pentru streptococii grupului A, specificitatea antigenică este dată de ramnoză-N-acetilglucozamină; pentru grupul B – ramnoză-glucozamină; pentru grupul C – ramnoză-N-acetilgalactozamină; pentru grupul D – acidul glicerolteichoic – D-alanina şi glucoza; pentru grupul F – glucopiranozil-N-acetilglucozamina. Pe baza polizaharidului C din structura peretelui celular (N-acetilglucozamina şi ramnoza) s-au identificat 18 serogrupuri Lancefield la grupul A. Specificitatea antigenică a polizaharidului capsular se foloseşte pentru clasificarea tulpinilor de *S. pneumoniae* în mai mult de 90 de tipuri serologice şi pentru tipizarea streptococilor de grup B (*Str. agalactiae*);

** Liza completă a eritrocitelor, cu clarificarea zonei în jurul coloniei este denumită hemoliză β (fig. 76). Liza incompletă cu formarea pigmentului verde este denumită hemoliză de tip α (fig. 79). Alţi streptococi sunt nehemolitici sau γ-hemolitici, care nu produc hemoliză nici la suprafaţă şi nici în profunzimea agarului (fig. 78).

Taxonomia numerică, tehnicile enzimatice şi metodele genetice au relevat o mare diversitate taxonomică în cadrul familiei *Streptococcaceae*.

Criteriile fenotipice au permis stabilirea a 12 genuri, şi anume: *Enterococcus*; *Lactococcus; Streptococcus*; *Alloiococcus*; *Globicatella*; *Helcococcus*; *Tetragenococccus*; *Vagococcus*; *Deinococcus; Abiotrophia; Pediococcus; Gemella,* separate după următoarele criterii: caracterele de cultură şi de colonie, morfologie, modul de grupare, mobilitate, diferite particularităţi biochimice (tipul de hemoliză), rezistenţa la factori fizico-chimici (producerea -pirolidonil –aril- amidazei, hidroliza esculinei, comportamentul în prezenţa sărurilor biliare, producerea de gaz din glucoză, capacitatea de a creşte în prezenta de NaCl 6%, la 10 sau 45°C, sensibilitatea la vancomicină), specificitatea serologică a antigenelor parietale şi habitat.

După criterii moleculare (ARNr 16S), genul *Streptococcus* este divizat în cinci grupuri:

grupul I: streptococii piogeni (*Str. pyogenes – grup A* (fig. 76, 77), *Str. agalactiae – grup B*, *Str. equi*, *Str. zooepidemicus* – grup C6). Mai nou, speciile de streptococi piogeni aparţinând sero-grupurilor C şi G sunt grupate în aceeaşi specie cu două subspecii: *dysgalactiae* (*aureus*) (uman) şi *equisimilis* (animal);

grupul II: lactococii (streptococi de grup D, non *Enterococococcus, Str. bovis* (necesită identificare rapidă – agent al endocarditelor, septicemiilor, neoplaziei de colon), *Str. equinus*, *Str. alactolyticus*, *Str. sacharolyticus*) (fig. 78);

grupul III: streptococii viridans (*Str. pneumoniae, Str. oralis*, *Str. sanguis* şi grupul *Str. milleri- Str. anginosus, Str. constellatus, Str. intermedius*) (fig. 79);

grupul IV: *Str. mutans*;

grupul V: *Str. salivarius, Str. vestibularis* şi *Str. haemophylus.*

Fig. 76. a. Lanţuri de streptococi în frotiul din supuraţie purulentă, colorat Giemsa (stânga); hemoliză completă (β-hemoliză) pe mediu cu sânge (mijoc); lanţuri de streptococi pe frotiu colorat Gram (dreapta) (Todar, 2008).

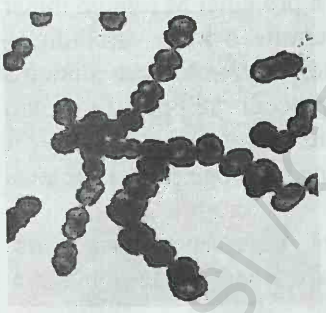


Fig. 77. Modul de grupare a celulelor de *Str. pyogenes* (după Todar, 2008).

Fig. 78. Streptococ γ hemolitic (după http://microamicrobes.blogspot.com/).

Fig. 79. Aspectul unei culturi de streptococ α hemolitic (http://microamicrobes.blogspot.com/).

6.2.1. *Streptococcus pyogenes*

Cei mai mulţi streptococi ce conţin antigenul de grup A aparţin speciei *Str. pyogenes* (β-hemolitic de grup A), component al microbiotei normale a tractului respirator superior (la mai puţin de 15% dintre indivizii umani). *Str. pyogenes* este prototipul patogenilor umani, care invadează local ţesuturile sau sistemic şi produce dezechilibre imunitare post-infecţioase.

Streptococii din grupul A (β-hemolitici pe geloza cu sânge de berbec) sunt patogeni extracelulari, care produc o gamă variată de infecţii la nivelul mucoaselor, tractului respirator (amigdalite, faringită, pneumonie), pielii şi ţesuturilor profunde (impetigo/pioderma, celulite, fasciite necrozante), sindromul toxic streptococic, scarlatina, septicemie, meningită, maladii cu o componentă autoimună (afecţiuni alergice, sechele post-streptococice -febra reumatică, glomerulonefrita).

Infecţiile pot fi uşoare sau foarte severe, cu complicaţii (septicemia, pneumonia şi meningita) care pot evolua letal (fig. 80).

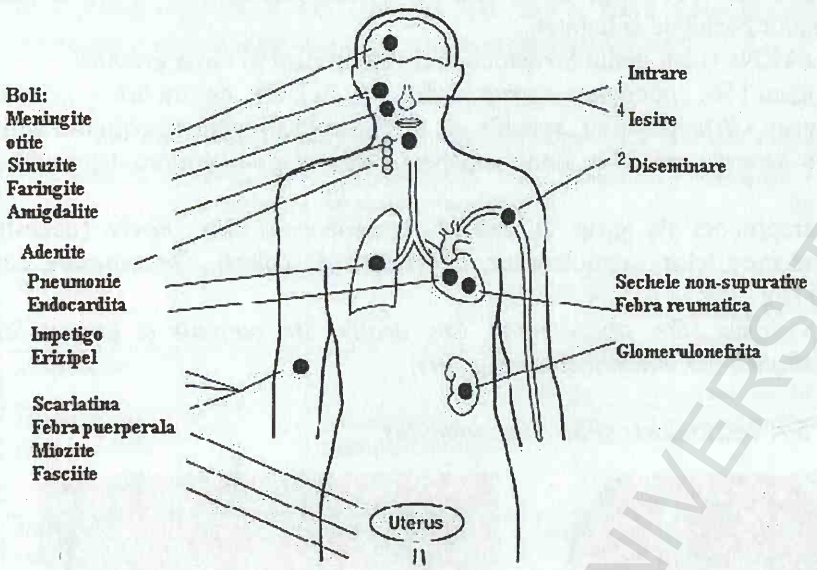


Fig. 80. Localizarea proceselor infecţioase streptococice şi entităţile clinice produse în organismul uman (după Todar, 2008).

Structura antigenică şi factorii de virulenţă

Proteina M este o moleculă majoră de suprafaţă şi un factor de virulenţă al streptococilor de grup A. Au fost identificate mai mult de 150 de serotipuri ale proteinei M. Datorită diversităţii antigenice, o persoană poate suferi infecţii repetate cu *Str. pyogenes* grup A, cu variante distincte ale proteinei M. Proteina M apare sub forma unor proiecţii fibrilare pe suprafaţa peretelui celular. Există două clase structurale majore de proteine M, clasa I şi II. Regiunea C-terminală este transmembranară, iar regiunea N-terminală este extracelulară. Regiunea extramembranară a proteinei M este un dimer cu structură suprahelicală α-helix. Organizarea pe domenii structurale permite o mare variabilitate de secvenţă şi variaţia antigenică, cu menţinerea funcţionalităţii moleculei. Tulpinile care sintetizează proteina M sunt virulente: în absenţa anticorpilor anti-proteină M, streptococii nu pot fi fagocitaţi de polimorfonucleare. Se pare că proteina M dar şi alte antigene parietale au rol în patogeneza febrei reumatice. Proteina M este prezentă şi la streptococii de grup G, iar gene omologe pentru proteina M au fost identificate la tulpini aparţinând serogrupurilor C şi G.

Substanţa T, termosensibilă şi acido-labilă, obţinută după tratamentul proteolitic al streptococilor şi inactivarea proteinei M, permite diferenţierea unor streptococi prin aglutinare cu seruri specifice;

Un alt antigen de suprafaţă identificat la streptococii de grup A este proteina R.

Extracţia cu soluţii slab alcaline a permis evidenţierea unor alte substanţe cu slabă specificitate serologică denumită substanţa P.

Toxine şi enzime. Str. pyogenes produce peste 20 de tipuri de molecule extracelulare (fig. 81):

- *streptokinaza* (fibrinolizina) transformă plasminogenul din plasma umană în plasmină, o enzimă proteolitică ce digeră fibrina şi alte proteine, imunogenă, utilizată în tratamentul emboliilor pulmonare, coronariene şi trombozelor venoase; streptokinaza a fost asociată cu patogeneza glomerulonefritei poststreptococice acute, probabil datorită capacităţii de a se lega la membrana bazală glomerulară şi de a activa plasminogenul, generând astfel nefritele.

- *streptodornaza* (o dezoxiribonuclează) depolimerizează ADN. *In vitro* scade vâscozitatea suspensiei de ADN; exsudatele purulente sunt vâscoase datorită acumulării deoxiribonucleoproteinelor, rezultate din liza tisulară. Amestecuri de streptodornaze şi streptokinaze sunt utilizate pentru lichefierea exsudatelor şi facilitarea pătrunderii antibioticelor şi a drenării puroiului şi ţesuturilor necrozate. Anticorpii anti DN-ază apar în infecţiile cutanate streptococice (> 100 unităţi).
- *hialuronidaza*, enzima care clivează acidul hialuronic din substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv şi favorizează diseminarea tisulară a agentului infecţios. Hialuronidaza este antigenică, are specificitate de tulpină şi induce sinteza anticorpilor specifici;
- *exotoxinele* streptococice eritrogene sau pirogene sunt binecunoscute pentru pirogenitatea lor, amplificarea simptomelor şocului toxic şi proprietăţile superantigenice; exotoxinele pirogene au omologie de secvenţă cu enterotoxinele stafilococice A şi C;
- *exotoxina eritrogenă* (toxina pirogenă) are 3 variante distincte antigenic: A, B, C. Exotoxina A este produsă de streptococii de grup A, lizogenizaţi cu un fag; exotoxina este asociată cu febra scarlatinoasă;
- *difosfopiridin-nucleotidaza* lizează leucocitele;
- *hemolizine*: streptolizina O (SLO) cu proprietăţi hemolitice în stare redusă (grupe – SH disponibile), rapid inactivată în prezenţa O_2. SLO este antigenică şi induce sinteza anticorpilor specifici (ASLO). Titrul mai mare de 160–200 U este indicatorul unei infecţii recente cu *Str. pyogenes* sau indică un nivel crescut al anticorpilor persistenţi, datorită unui răspuns imun de intensitate prea mare la o persoană hipersensibilă, ca rezultat al unei expuneri secundare la antigenele bacteriene; streptolizina S (SLS), *in vitro*, este β-hemolitică. Simbolul "S" semnifică stabilitatea acestei proteine-enzime în prezenţa oxigenului. Nu este antigenică.

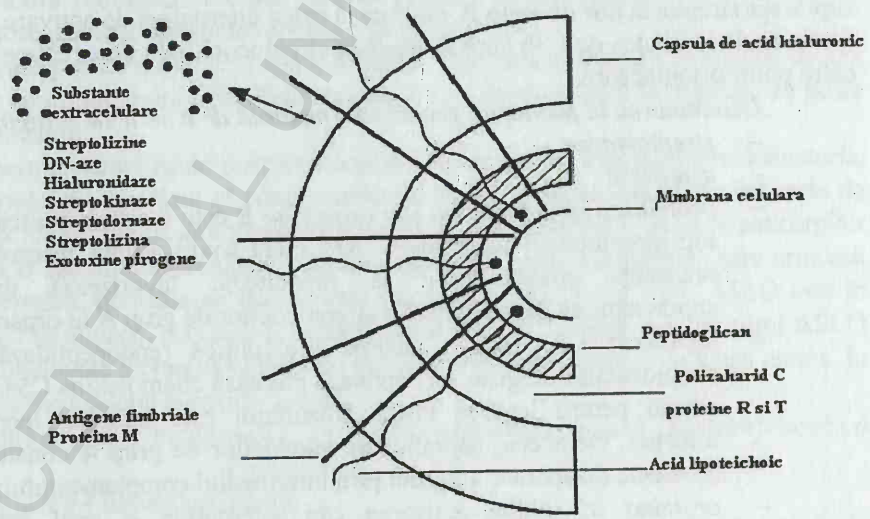


Fig. 81. Ilustrarea schematică a localizării celulare a factorilor de virulenţă la *Streptococcus* (după Todar, 2008).

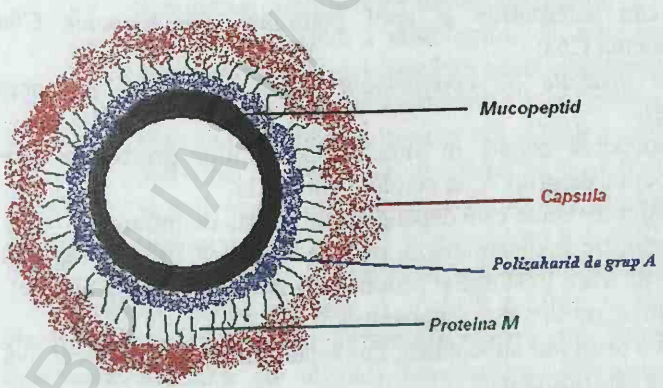


Fig. 82. Componentele antigenice extracelulare ale streptococilor de grup A (după Stool Miller şi Dorfman, 1996).

Etapele infecţiei streptococice

Aderenţa la celulele epiteliale este mediată de *adezine*. Cele mai importante adezine sunt proteina M şi acizii lipoteichoici (LTA), deoarece anticorpii specifici previn colonizarea bacteriană în organismul animal, cu efect protector faţă de infecţiile letale cu streptococi de grup A (fig. 82).

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

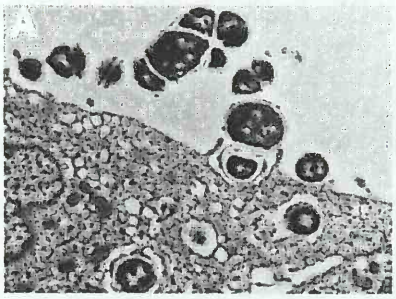


Fig. 83. Imagine electrono-optică a etapelor endocitării *Str. pyogenes* în celulele HEp-2 (după Todar, 2008).

Invazia intracelulară. Cercetările recente sugerează că streptococii de grup A nu numai că aderă la celulele epiteliale, dar le şi invadează. Streptococii de grup A au potenţialul de a invada celulele epiteliale umane cu frecvenţă egală sau chiar mai mare decât patogenii bacterieni intracelulari clasici, *Listeria* sp. şi *Salmonella* sp. (La Penta şi colab., 1994) (fig. 83). Raportul iniţial a stârnit un amplu interes şi a fost confirmat şi de alte cercetări. Invazia masivă presupune exprimarea *proteinei M şi/sau a proteinelor care leagă fibronectina,* precum SfbI. *Atât proteina M1 cât şi SfbI sunt considerate invazine pentru că particulele de latex învelite cu oricare dintre aceste proteine sunt internalizate eficient de celulele epiteliale.* În plus, mutaţii ale genelor care codifică pentru aceste proteine reduc capacitatea streptococilor de a invada celulele *in vitro*. Cele mai recente lucrări descriu invazia masivă a celulelor epiteliale, cu streptococi de grup A, serotip M1. În timpul procesului de invazie are loc rearanjarea componentelor citoscheletului. Semnificaţia invaziei celulelor gazdei nu este clară, deşi streptococii pot folosi mediul intracelular pentru a evita mecanismele de apărare ale gazdei. De aceea, internalizarea streptococilor poate duce la cronicizarea infecţiei.

Evitarea efectorilor imunitari ai gazdei

Capsula streptococilor de grup A este formată din *acid hialuronic*, un polimer cu unităţi repetitive de acid glucuronic şi N-acetilglucozamină (identic polizaharidului din umoarea vitroasă bovină şi din cordonul ombilical uman) (Stool Miler şi Dorfman, 1996), având rol antifagocitar şi fiind implicată în aderenţa de epiteliul faringelui, deoarece leagă CD44 de pe celulele epiteliale.

Legarea fibrinogenului şi a factorului H de activare a complementului la proteina M de pe suprafaţa streptococilor de grup A blochează calea alternativă de activare a complementului şi reduce foarte mult cantitatea de C3b care se leagă la streptococi, fapt care reduce fagocitoza streptococilor de către polimorfonucleare.

Diseminarea în ţesuturile gazdei este mediată de o serie de proteine şi enzime extracelulare:

- *streptokinaze*
- *exotoxine*
- *proteinaza streptococică sau exotoxina B* este o cistein-protează extracelulară produsă de toţi streptococii de grup A. Are efect toxic asupra macrofagelor, ceea ce determină rezistenţa streptococilor la fagocitoză, favorizează diseminarea bacteriană şi supravieţuirea extracelulară a streptococilor de grup A în organismul gazdă;
- *peptidaza C5a* este o enzimă proteolitică (endopeptidază), localizată pe suprafaţa streptococilor de grup A. Peptidaza clivează chemotaxina C5a derivată din complement la situsul pentru legarea PMN. Rezultatul este inhibiţia recrutării fagocitelor la locul infecţiei. De aceea, suprafaţa streptococilor de grup A constituie o barieră dublă pentru sistemele de apărare a gazdei prin intermediul complementului;
- *proteina M* inhibă activarea căii alternative şi apoi peptidaza streptococică C5a inactivează chemotaxia şi componenta C5a;
- *inhibitorul streptococic al lizei mediate de complement* inhibă, *in vitro,* formarea complexului de atac al membranei.

Răspunsul gazdei la infecţia streptococică constă în sinteza anticorpilor protectori anti-proteina M, inhibitori ai aderenţei ai streptococilor de grup A, la celulele epiteliale.

Patologie. Tabloul clinic al infecţiei streptococice este dependent de poarta de intrare.

Tulpinile *invazive* de streptococ β-hemolitic se disemineză, pe cale limfatică, difuz şi rapid în ţesuturi, cu supuraţie minimă. Din limfă, infecţia trece în sânge şi produce următoarele entităţi clinice:

- *erizipelul* streptococic, dacă poarta de intrare este tegumentul;
- *celulita*, o infecţie acută a pielii şi a ţesutului subcutanat, cu răspândire rapidă, consecutivă traumatismelor, arsurilor, inciziilor chirurgicale;
- *fasciita necrozantă* (gangrena streptococică), o infecţie a ţesutului subcutanat şi a fasciei, cu necroză extinsă şi progresie rapidă;

– *febra puerperală*, datorată infecției uterine postpartum, cu evoluție septicemică;
– *bacteriemia* (septicemia) consecutivă traumatismelor deschise sau inciziilor chirurgicale, poate fi rapid fatală.

Infecția invazivă cu streptococi de grup A poate să producă *sindromul de șoc toxic* și *febra scarlatinoasă*.

Sindromul de șoc toxic se caracterizează prin starea de șoc, bacteriemie, insuficiență respiratorie și a altor organe (ficat, rinichi). Moartea survine la 30% dintre pacienți. La persoanele sănătoase, infecția este consecutivă unor traume minore, la nivelul leziunilor se inițiindu-se infecția țesuturilor moi, fasciita necrozantă, miozita.

Febra scarlatinoasă este produsă de exotoxinele A-C pirogene, eliberate de *S. pyogenes* cu localizare faringiană. Faringita poate fi foarte severă. Erupția tegumentară apare pe trunchi în 24 de ore și implică ulterior extremitățile.

Infecțiile *locale* cu streptococ β-hemolitic produc:
– *faringita*. Bacteriile aderă la epiteliul faringian prin intermediul adezinelor (LTA și proteina M). Acidul lipoteichoic se fixează pe fibronectina care tapetează celulele epiteliale. La copii, infecția tractului respirator superior nu implică plămânul, dar se poate extinde în urechea medie și zona mastoidiană. La adolescenți și adulți, infecția este mai severă;
– *piodermita streptococică* (impetigo), o infecție locală a straturilor superficiale ale tegumentului, în special la copii, ce se manifestă prin apariția unor vezicule superficiale care se sparg. Este foarte contagioasă, în special în climatul cald și umed.

Sechele nonsupurative post-streptococice

După infecția acută cu *Str. pyogenes*, urmează o perioadă de latență de 1–4 săptămâni, după care evoluează nefrita sau febra reumatică. Aceste maladii nu sunt consecința directă a procesului infecțios diseminat, ci se datorează unei reacții de hipersensibilitate.

Glomerulonefrita acută poststreptococică apare inițial la copii și adolescenți, în special de sex masculin (raportul cazurilor de îmbolnăvire băieți/fete este de 2:1) și de asemenea la indivizii de peste 40 de ani cu condiții predispozante.

Caracteristicile glomerulonefritei acute poststreptococice includ edem, hipertensiune, hematurie, anomalii ale sedimentului urinar, nivel scăzut al complementului în ser și febră moderată. Perioada de latență între infecția streptococică și apariția glomerulonefritei este de 1–4 săptămâni, iar titrul anticorpilor antistreptococici anti-DN-ază B sau antihialuronidază este înalt. În cazul glomerulonefritei, care urmează piodermitei sau infecțiilor dermice, perioada de latență este de 3–6 săptămâni, iar titrul ASLO este în general scăzut. După infecțiile faringiene, perioada de latență poate fi de 1–2 săptămâni, iar titrul ASLO poate fi ridicat. Atacurile recurente ale glomerulonefritei nu provoacă de obicei sechele de lungă durată, în general leziunile rinichiului, având caracter temporar la copii.

Mecanismele potențiale ale patogenezei în glomerulonefrita acută poststreptococică sunt multiple:
– depunerea complexelor imune circulante;
– reacția încrucișată a anticorpilor cu antigenele glomerulare și streptococice (serul de la pacienții cu glomerulonefrită acută poststreptococică conține anticorpi anti-laminină, anti-colagen și față de alte molecule din membrana bazală glomerulară);
– lezarea țesutului glomerular sub acțiunea proteinazei sau streptokinazei streptococice;
– activarea directă a complementului în glomeruli (exotoxina B se concentrează în glomerul și activează complementul pe calea alternativă, pe de altă parte, capacitatea de legare a plasminei ar avea rol în penetrarea țesuturilor de către complexul exotoxina B-plasmină, unde excesul de plasmină poate activa complementul și produce inflamarea glomerulilor).

Febra reumatică este o sechelă tardivă a faringitei produse de streptococii de grup A. Manifestările maladiei sunt: inflamații ale articulațiilor (artrita), ale inimii (cardite), ale SNC (chorea Sydenham asociată cu mișcări involuntare, slăbiciune musculară și tulburări emoționale), ale tegumentului (*eritema marginatum* și/sau noduli subcutanați). Leziunile mușchiului cardiac și ale valvelor sunt cele mai grave. Unele tulpini de *Str. pyogenes* de grup A au antigene membranare care

reacţionează încrucişat cu antigene ale ţesutului cardiac. Serul pacienţilor cu febră reumatică conţine anticorpi specifici faţă de acest grup de antigene. Febra reumatică se manifestă prin febră, frisoane, poliartrită migratoare nesupurativă, inflamaţia endo-, mio- şi pericardului. Cardita duce la îngroşarea şi deformarea valvelor şi formarea unor granuloame mici în miocard. Febra reumatică are tendinţa marcată de reactivare, spre deosebire de nefrită.

Eritema marginatum este o erupţie distinctă cu pustule roşii, caracteristică febrei reumatismale. *Nodulii subcutanaţi* apar pe suprafaţa încheieturilor şi coloanei vertebrale ca şi în *lupusul eritematos sistemic*.

Febra reumatismală are un mecanism autoimun şi apare cel mai probabil după sinteza anticorpilor care reacţionează încrucişat cu componente ale streptococilor de grup A şi ale ţesuturilor gazdei (miozina, tropomiozina şi keratina, ADN, N-acetil glucozamina).

Artrita reactivă streptococică este nepurulentă şi apare după infecţia cu streptococi de grup A. Tratamentul cu aspirină sau salicilaţi nu este foarte eficace, spre deosebire de febra reumatismală, care este tratată cu doze înalte de aspirină.

Tulburări neurologice. Cercetări recente au evidenţiat corelaţia între infecţiile cu streptococi de grup A şi declanşarea unor tulburări obsesiv-compulsive (Allen şi colab., 1995). Un subgrup de ticuri şi comportamente obsesiv-compulsive la copii, precedate de infecţii cu streptococi de grup A, au fost definite ca tulburări neuropsihice autoimune pediatrice asociate cu infecţii streptococice (PANDAS). Pacienţii cu PANDAS exprimă markerul DR8/17 cu aceeaşi rată ca şi pe celulele DR^+ din sângele periferic al pacienţilor cu febră reumatismală (Swedo şi colab., 1997).

Infecţia streptococică induce creşterea titrului de anticorpi serici faţă de numeroase antigene: anti-DN-ază, anti-hialuronidază, anti-streptokinază, anti-proteină M. Cei mai importanţi din punct de vedere practic sunt anticorpii anti-SLO (ASLO).

Rezistenţa la infecţia streptococică are specificitate în raport cu varianta antigenică a proteinei M. După vindecarea infecţiei cu *Str. pyogenes* cu o anumită variantă a proteinei M, persoana devine rezistentă la reinfecţia cu aceeaşi variantă, dar rămâne sensibilă faţă de toate celelalte variante antigenice ale streptococilor, conferite de proteina M. Anticorpii anti-proteină M opsonizează celulele bacteriene, care sunt fagocitate de polimorfonucleare. În absenţa anticorpilor opsonizanţi, proteina M este chimiotactic negativă faţă de fagocite.

Anticorpii anti-SLO blochează hemoliza mediată de SLO, dar nu sunt protectori. Titrul crescut ASLO (mai mare de 250 U) denotă infecţia recentă sau infecţii repetate şi se întâlneşte în special la persoanele reumatice.

Epidemiologie. Sursa infecţioasă cu streptococi de grup A este o persoană purtătoare, cu infecţie clinică sau subclinică, un purtător care elimină agentul infecţios din tractul respirator prin aerosoli, sau diseminează prin contact tegumentar direct.

Tratamentul de elecţie este reprezentat de penicilină sau macrolide (eritromicina) care trebuie administrate precoce în infecţiile acute (înainte de ziua a 8-a de infecţie), timp de 10 zile pentru a realiza sterilizarea bacteriologică a indivizilor şi a preveni apariţia complicaţiilor tardive. Tratamentul cu antibiotice este de asemenea util pentru prevenirea reinfecţiei cu streptococi de grup A a pacienţilor cu febră reumatismală. Tratamentul cu antibiotice nu mai este eficient după instalarea complicaţiilor tardive cu componentă autoimună.

6.2.2. ***Streptococcus agalactiae*** aparţine grupului Lancefield B. Este β-hemolitic, pozitiv pentru testul CAMP (fig. 84, 85), component al microbiotei vaginale la 5–25% dintre femei. Infecţia nou-născutului poate duce la septicemie fulminantă sau la meningită.

Unele bacterii posedă hemolizine incomplete, care pot induce formarea de pori în membrana eritrocitelor doar în prezenţa unei enzime solubile denumite *sfingomielinaza C*, secretată de tulpini de *S. aureus* β–hemolitice. Pentru detectarea factorilor CAMP sau CAMP-*like,* tulpinile de cercetat se însămânţează sub formă de striuri paralele pe geloză-sânge, iar perpendicular pe aceste striuri, la 8 mm distanţă, se însămânţează o tulpină de *S. aureus* β– hemolitică. Prezenţa factorului CAMP este indicată de apariţia unei zone sinergice, mărite, de hemoliză completă la extremitatea striurilor din vecinătatea tulpinii de *S. aureus* β–hemolitică, cu aspect de "săgeată", în timp ce pe restul lungimii striului de cultură se observă hemoliză incompletă sau chiar absenţa hemolizei.

Fig. 84. Test pentru evidențierea producerii factorului CAMP la tulpini de *Str. agalactiae* (orizontal, în prezența unei tulpini de *S. aureus* α-hemolitice).

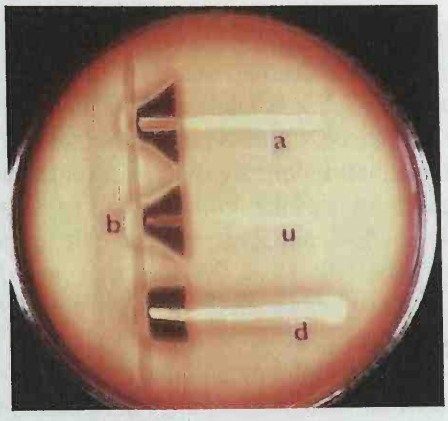


Fig. 85. Aspectul hemolizei sinergice indusă de diferite specii care produc hemolizine incomplete. Vertical: *S. aureus* producător de β-hemolizină; orizontal: (a) *Str. agalactiae* (CAMP-pozitiv), (u) *Str. uberis* (CAMP-*like* pozitiv), (d) *S. aureus* producător de δ-hemolizină (CAMP-*like* pozitiv) http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16.

6.2.3. *Streptococii de grup C şi G* formează adesea pe geloză sânge colonii asemănătoare cu cele de *Str. pyogenes,* pot fi rezidenți ai microbiotei orofaringiene şi pot produce faringite, sinuzite, bacteriemii şi endocardite.

6.2.4. *Streptococcus pneumoniae*

Str. pneumoniae a fost izolat în 1881. Este o bacterie Gram pozitivă, cu morfologie de lancedați, grupați în perechi (fig. 86) sau în lanțuri scurte, α-hemolitică, nesporulată, imobilă, catalazo-pozitivă. Celulele îmbătrânite se colorează Gram negativ şi ulterior se lizează spontan. Bila de bou (10%) sau dezoxicolatul de sodiu (2%) produc liza celulelor bacteriene crescute în bulion în câteva minute, probabil prin inactivarea inhibitorilor autolizinelor peretelui celular. Alți streptococi viridans care produc hemoliză α nu se lizează şi astfel este posibilă diferențierea. Se cultivă în atmosferă de CO_2 (5–10%). Pe mediul solidificat, coloniile sunt mici, sferice, α-hemolitice. La primele pasaje coloniile pot avea aspect mucoid datorită capsulei abundente. Fermentează glucoza cu formarea acidului lactic, care limitează creşterea.

Str. pneumoniae se găseşte în microbiota normală la o proporție importantă a indivizilor umani (5–40%) şi poate produce bronşită, pneumonie, sinuzită, otită, bacteriemie, meningită. Capsula polizaharidică face posibilă identificarea cu antiser specific (fig. 87).

Str. pneumoniae este cea mai frecventă cauză a pneumoniei bacteriene comunitare, deoarece colonizează inițial nazofaringele, apoi ajunge la plămân prin trompa lui Eustachio. Este a doua cauză a meningitei bacteriene şi otitei medii la copii, după *H. influenzae.*

Fig. 86. Frotiu din puroi cu *Str. pneumoniae*, colorație May Grünwald Giemsa (după Todar, 2008).

Fig. 87. Capsula la *Str. pneumoniae* (după Todar, 2008).

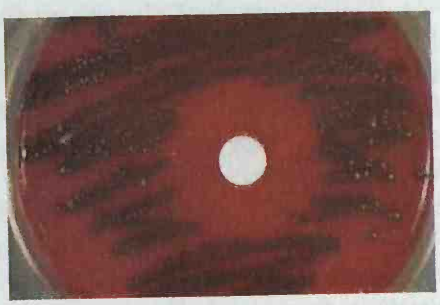


Fig. 88. Str. pneumoniae. Evidențierea α hemolizei şi a zonei de inhibiție din jurul discului impregnat cu optochin (după Todar, 2008).

Tulpinile care colonizează nazofaringele formează colonii transparente, iar cele invazive dau colonii transparente sau opace pe geloză-sânge. 20% dintre izolate sunt strict anaerobe.

Str. pneumoniae are sensibilitate înaltă la optochin (diametrul zonei de inhibiție este mai mare de 16 mm), spre deosebire de alți streptococi viridans, care sunt rezistenți (fig. 88).

BCU "IOAN CENTRU" UNIVERSITY LIBRARY

La suprafaţa celulei se găsesc 3 structuri majore: membrana plasmatică, peretele celular şi capsula. Izolatele care sintetizează cantităţi mari de polizaharid extracelular formează colonii mari, mucoide. După câteva pasaje *in vitro*, celulele nu mai sintetizează polizaharidul capsular, dar redevin capsulate după inocularea la şoarece. Capsula constă din polimeri cu greutate moleculară mare, alcătuiţi din unităţi repetitive de oligozaharide formate din 2–8 monozaharide. La unele serotipuri, fosforil colina este componentă a polizaharidului capsular. Polizaharidul capsular este legat covalent de peptidoglican şi este distinct din punct de vedere antigenic pentru cele peste 90 de serotipuri capsulare de *Str. pneumoniae*. Serotipurile 6, 14, 18, 19 şi 23 sunt cele mai frecvente (produc 60–80% din totalul infecţiilor clinice). Capsula este un important factor de virulenţă, tulpinile capsulate fiind de cel puţin 10^5 ori mai virulente decât tulpinile necapsulate (AlonsodeVelasqo şi colab., 1995; Todar, 2008).

Reacţia imună a polizaharidului cu anticorpii specifici din serul policlonal se evidenţiază prin fenomenul de umflare a capsulei (reacţia *Quellung*) şi aglutinarea celulelor, datorită legării încrucişate a anticorpilor care formează punţi intercelulare. Reacţia este adeseori folosită pentru identificarea pneumococilor direct din spută sau din cultură.

Peretele celular are o structură tipic Gram pozitivă şi este alcătuit în primul rând din peptidoglican. Polizaharidul asociat peretelui celular (PsaA) (fig. 89) este un acid teichoic, care conţine resturi de fosforil-colină, legat de peptidoglican prin acidul N-acetilmuramic. Resturile de fosforil-colină sunt sensibile la amidaza N-acetilmuramic-L-alanină, o enzimă ce clivează peptidoglicanul în glican şi catenele peptidice, pentru că hidrolizează legătura dintre Ala şi acidul N-acetilmuramic. Enzima are rol în procesul diviziunii celulare, deoarece clivează peptidoglicanul şi se numeşte *autolizină*, deoarece induce liza pneumococilor în faza staţionară a culturii, reflectată în schimbarea morfologiei cu intruzia centrului coloniei. Autolizina este factor de virulenţă: mutantele negative pentru autolizină sunt mai puţin virulente decât cele sălbatice. Efectele autolizinei par să fie indirecte, mediate de eliberarea pneumolizinei din citoplasma pneumococului.

Acidul lipoteichoic sau antigenul Forssman este un acid teichoic asemănător cu polizaharidul peretelui celular, dar are componenta lipidică ataşată covalent. Antigenul este inserat în membrana plasmatică prin jumătatea lipidică şi conţine fosforil-colină, prin intermediul căreia *Str. pneumoniae* aderă la receptorii de colină, ubiquitari pe suprafaţa celulelor animale (receptorul pentru PAF- factorul activator al plachetelor şi proteina C-reactivă). Fosforil colina este prezentă şi la alţi patogeni (*Haemophilus sp., Pseudomonas sp., Neisseria sp.* şi *Mycoplasma sp.*), fiind probabil implicată în invazie printr-un mecanism asemănător.

Antigenul Forssman este un inhibitor puternic al autolizinei, iar resturile de fosforil-colină sunt implicate în interacţiunea specifică cu enzima. În faza staţionară, celulele de pneumococ eliberează antigenul Forssman. Pierderea acestui inhibitor al enzimei, urmată de activitatea autolizinei duc la liza peretelui celular.

Proteine. Pneumococul produce circa 500 de proteine de suprafaţă, dintre care unele au rolul de factori de virulenţă: proteaza ce hidrolizează IgA_1 şi astfel interferă cu apărarea mucoaselor; neuraminidaza şi hialuronat-liaza ce facilitează ataşarea de celulele epiteliale, prin clivarea acidului sialic din glicolipidele şi din gangliozidele gazdei; alte proteine ale suprafeţei implicate în aderenţa pneumococului de celulele epiteliale şi endoteliale. A fost descrisă o proteină (CpbA – *complement binding protein*) capabilă să lege complementul şi factorul H, inhibând astfel activarea complementului şi fagocitoza (Jedrzejas, 2001).

Pneumolizina este o proteină intracelulară, ce aparţine familiei toxinelor activate de thiol. Nu este secretată, dar este eliberată prin liza celulelor bacteriene, sub influenţa autolizinei. Efectul toxic constă în formarea porilor transmembranari prin asocierea oligomerilor de pneumolizină. Rezultatul este liza celulei.

In vivo, pneumolizina stimulează eliberarea citokinelor proinflamatorii (TNFα şi IL-1β) de către monocite, inhibă mişcarea cililor celulelor epiteliului respirator, iar *in vitro* lizează celulele epiteliale ale tractului respirator superior şi alveolare, inhibă migrarea neutrofilelor şi activitatea lor bactericidă, inhibă expansiunea clonelor de limfocite şi sinteza Ac.

Pneumolizina activează calea clasică a complementului, în absenţa Ac specifici (anti-pneumolizină). Din acest punct de vedere, pneumolizina este asemănătoare proteinei de fază acută CRP (proteina C reactivă). După ce se leagă de resturile de fosforil-colină ale polizaharidului parietal,

CRP activează calea clasică a complementului prin legarea C1q. Pneumolizina leagă direct C1q. Activând complementul, pneumolizina amplifică procesul inflamator. Deoarece lizează celulele epiteliale ale tractului respirator, pneumolizina uşurează tranzitul pneumococului în sânge. Mutantele negative pentru pneumolizină sunt mai puţin virulente decât tulpinile de tip sălbatic.

Proteina A (PspA) (fig. 89) a suprafeţei pneumococului, probabil transmembranară, pare să inhibe activarea complementului şi astfel măreşte gradul de virulenţă a pneumococului.

Patogeneza. Str. pneumoniae colonizează în tractul respirator superior la mulţi indivizi sănătoşi. Scăderea rezistenţei organismului gazdă favorizează iniţierea procesului infecţios. Rezistenţa scade datorită unor cauze diverse:

- lezarea celulelor epiteliale ale tractului respirator datorită infecţiei virale sau altor infecţii;
- acumularea anormală a secreţiei mucoase (în stările alergice), care protejează pneumococul de fagocite;
- intoxicaţia cu alcool sau cu medicamente, ce supresează acţiunea fagocitelor şi reflexul de tuse;
- tulburări ale circulaţiei (congestia pulmonară, insuficienţa cardiacă).

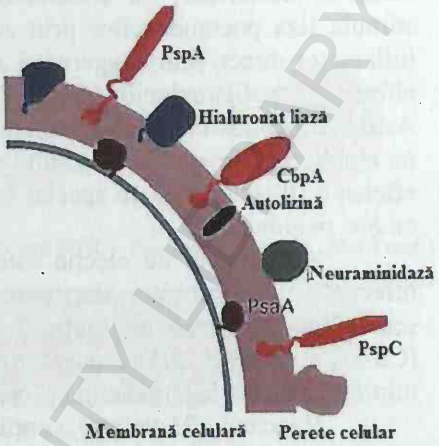


Fig. 89. Reprezentarea schematică a factorilor de virulenţă la *Str. pneumoniae* (după Jedrzejas, 2001).

Pneumococul se ataşează de o grupare dizaharidică a fibronectinei, componentă a matricei celulelor epiteliale faringiene.

Procesul patologic se datorează multiplicării bacteriei în ţesuturi. Pneumococul nu produce toxine. Virulenţa este atribuită diferitelor structuri, majoritatea situate pe suprafaţa celulei, care induc un puternic răspuns inflamator din partea gazdei, prezent în toate afecţiunile produse de pneumococi. Capsula este factorul major de virulenţă al *Str. pneumoniae*, deoarece este chimiotactic negativă pentru fagocite. Structura chimică a polizaharidului capsular condiţionează capacitatea diferită a serotipurilor de a supravieţui în sânge şi de a invada ţesuturile. Diferenţele biochimice ale numărului mare de serotipuri se reflectă în capacitatea de a activa calea alternativă a C, depunerea şi degradarea componentelor C pe capsulă, rezistenţa la fagocitoză, capacitatea de a induce sinteza anticorpilor.

Modificările proprietăţilor suprafeţei celulelor sau ţesuturilor pot influenţa virulenţa unui agent infecţios, direct proporţional cu amploarea modificărilor. *Str. pneumoniae* colonizează tractul respirator al circa 40% dintre indivizii umani, dar numai 0,5% fac pneumonie evidentă, otită medie sau septicemie. În plămânul uman, celulele de pneumococ care produc colonii opace şi respectiv transparente, nu par să aibă vreun avantaj unele faţă de altele în colonizarea ţesutului pulmonar. Dacă un virus infectează tractul respirator, citokinele care se sintetizează activează receptorul pentru factorul de activare plachetară (PAF) de pe suprafaţa celulelor epiteliale pulmonare. Aderenţa pneumococului de celulele epiteliului faringian uman creşte semnificativ după infecţia cu virusuri (virusul influenza, virusul respirator sincitial). Virusurile aderă la receptorul pentru PAF. Efectul stimulator asupra aderenţei este mediat de neuraminidaza virală, deoarece enzima clivează acidul sialic din glicosfingolipide, prezente în cantităţi mari în ţesutul pulmonar uman. Neuraminidaza expune alte molecule cu rol de receptori pentru aderenţa pneumococilor care formează colonii transparente. Astfel se explică predispoziţia crescută a pacienţilor infectaţi cu virusuri, pentru complicaţiile produse de pneumococi: septicemie şi meningită.

După liza celulelor epiteliale, pneumococii sunt translocaţi din nazofaringe în plămân şi produc pneumonie sau migrează direct în sânge şi produc bacteriemie sau septicemie. Cele mai multe infecţii nu sunt consecinţa portajului îndelungat, ci apar după dobândirea unui serotip nou, ceea ce înseamnă că procesul patologic este condiţionat de statutul imunitar al gazdei în momentul colonizării şi de virulenţa tulpinii. Ineficienţa mecanismelor protectoare ale epiteliului tractului respirator (sIgA, reflexul de tuse, secreţia mucoasă şi transportul ciliar) datorată efectelor pneumolizinei asupra cililor celulelor epiteliale, cât şi efectelor proteazei asupra IgA_1, poate uşura progresia infecţiei spre bronhii şi plămâni.

Din sânge, pneumococul migrează în meninge şi după lezarea endoteliului ajunge în spaţiul subarahnoidian.

Multiplicarea pneumococului în plămân, meninge sau în urechea medie este urmată de liza celulelor bacteriene, cu eliberarea componentelor parietale şi a pneumolizinei. Lizozimul poate stimula liza pneumococilor prin activarea autolizinei. Liza celulelor bacteriene activează procesul inflamator direct, prin atragerea şi activarea fagocitelor sau indirect, prin activarea complementului şi eliberarea anafilatoxinelor (C3a şi C5a). Inflamaţia determină morbiditatea infecţiilor cu pneumococ. Astfel se explică faptul că eliminarea pneumococului din focarul infecţios sub acţiunea antibioticelor nu ameliorează evoluţia procesului patologic. Deoarece lizează celulele bacteriene, antibioticele foarte eficiente (β-lactamice), în special în stadiile tardive, pot să amplifice efectele patologice ale infecţiei cu *Str. pneumoniae*.

Antibioticul de elecţie este penicilina G, administrată în doze ridicate pentru tratamentul infecţiei pneumococice, dar spre deosebire de streptococii β-hemolitici care şi-au conservat sensibilitatea la acest antibiotic, în cazul pneumococilor 5–10% dintre tulpini sunt înalt rezistente (CMI>2μg/mL) şi 20% moderat rezistente (CMI = 0.1–1 μg/mL). Au fost raportate de asemenea tulpini rezistente la tetraciclină şi eritromicină.

Vaccinul (23-valent) conţine antigenele a 23 de tulpini de *Str. pneumoniae* (25 mg din serotipurile 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F şi 33F) a redus cu 80–90% frecvenţa infecţiilor invazive) (Artz şi colab., 2003). Polizaharidele nu sunt imunogene la copiii sub 2 ani.

6.2.5. Genul *Enterococcus*

Denumirea de "enterococi" a fost dată de Thiercelin (1899), pentru a desemna originea intestinală a unui diplococ nou izolat, Gram pozitiv. În 1899, Mac Callum şi Hastings au raportat un caz de endocardită, cauzată de o bacterie pe care au denumit-o *Micrococcus zymogenes*. În 1906, agentul infecţios izolat din endocardită a fost denumit *Str. faecalis*, deoarece este caracteristic intestinului uman.

Genul *Enterococcus* reuneşte coci intestinali Gram pozitivi, facultativ anaerobi, cu aspect ovoid (fig. 90). Pe frotiuri sunt grupaţi în lanţuri scurte, perechi sau celule izolate.

Ca şi streptococii, enterococii nu au citocromi (de aceea sunt negativi pentru reacţia catalazei). Cele mai multe tulpini de *Enterococcus* cresc în medii cu 6,5% NaCl, pH 9,6, între 10–45°C, supravieţuiesc 30 minute la 60°C. Enterococii sunt foarte rezistenţi la condiţii limitative (concentraţii bactericide de SDS, săruri biliare, căldură, etanol, peroxid de hidrogen, aciditate, alcalinitate, UV, hipoclorit de Na). *E. faecalis* poate de asemenea să intre în stare de latenţă, viabilă, dar non-cultivabilă, revenind la starea activă metabolic în condiţii favorabile.

Enterococii fac parte din microbiota normală, fiind adaptaţi la mediul complex al cavităţii orale şi tractului gastrointestinal şi vaginal, bogat în nutrienţi, lipsit de O_2. Densitatea cocilor Gram pozitivi este de 10^5–10^7 UFC (unităţi formatoare de colonii) /gram de conţinut fecal la indivizii sănătoşi. Enterococii reprezintă mai puţin de 0,01% din microbiota normală.

În laboratorul clinic, genul *Enterococcus* se identifică pe baza caracterelor morfologice ale culturii şi ale celulelor pe frotiul colorat Gram, a capacităţii de a hidroliza esculina în prezenţa bilei şi de a creşte în mediu cu adaos de 6,5% NaCl. Un test rapid de identificare foloseşte esculină 0,2% în soluţie de NaCl 5% tamponată, testul fiind pozitiv pentru toate tulpinile de *Enterococcus* la 24 de ore (fig. 91).

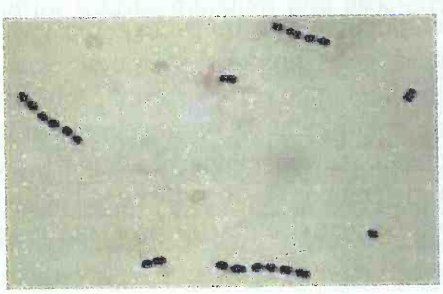


Fig. 90. Aspectul microscopic al enterococilor pe frotiu colorat Gram

Fig. 91. Aspectul creşterii culturii de *Enterococcus* sp. pe mediu bilă- esculină (BE) şi pe bulion cu 6.5% NaCl.

Leziuni tisulare	LTA
	Anion superoxid extracelular
	Gelatinază
	Hialuronidază
	Citolizină
Inducerea răspunsului inflamator	Feromoni de sex
	LTA

Enterococii exprimă molecule cu rol de adezine la celulele gazdei şi de matricea extracelulară, ceea ce le permite să invadeze ţesuturile şi să formeze abcese (AS, LTA), să elibereze toxine şi factori imunomodulatori (tabelul 11).

AS este o adezină proteică codificată plasmidial care mediază contactul între o celulă receptoare şi una donoare de material genetic, facilitând transferul de material genetic (fig. 95).

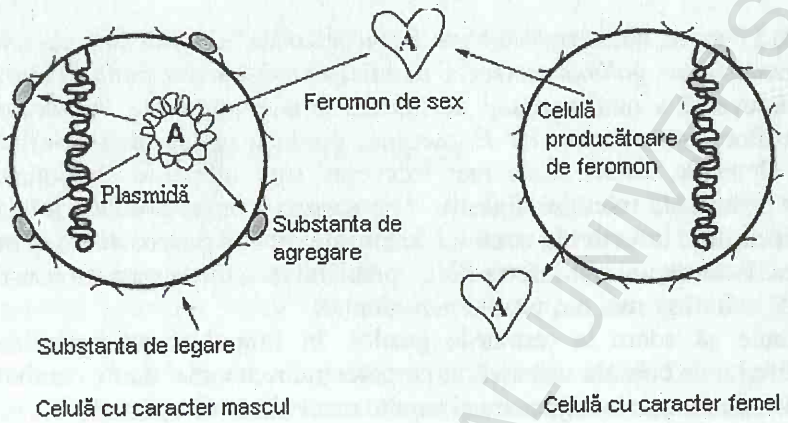


Fig. 95. Reprezentarea schematică a mecanismelor de comunicare intercelulară, bazate pe feromoni, care au loc în procesul conjugării (Murray, 1998).

AS este secretată de celula donoare, în timp ce celula receptoare secretă o substanţă de legare (BS- *binding substance*), codificată cromosomal. Complexul AS-BS are calitate de superantigen.
AS mediază de asemenea şi aderenţa enterococilor la o serie de tipuri de celule eucariote, inclusiv neutrofile şi la moleculele matricei extracelulare.

Adezinele de suprafaţă (*Enterococcus surface protein*) sunt proteine cu greutate moleculară mare identificate mai ales la tulpinile izolate din infecţii.

Feromonii de sex sunt peptide mici de semnalizare (7–8 aminoacizi) secretate în mediu de celulele receptoare de material genetic, care induc secreţia de AS de către celula donoare.

Acizii lipoteichoici (LTA) sunt adezine neproteice, care mediază aderenţa enterococilor la diferite tipuri de celule eucariote (plachete, eritrocite, limfocite, PMN, cellule epiteliale), stimulează sinteza citokinelor proinflamatorii (IL-1 β, IL-6, IL-8), PGE2, VEGF şi induc apoptoza celulei gazdă. LTA inhibă de asemenea autoliza celulelor bacteriene în prezenţa antibioticelor β-lactamice. Acest efect explică sensibilitatea redusă a enterococilor la unele antibiotice administrate parenteral (cefalosporine), care predispun la infecţiile cu enterococi şi sunt in mod considerabil asociate cu bacteriemia enterococică (Jett şi colab., 1994). Cantitatea de LTA se dublează în forma VBNC.

Unele tulpini, mai ales cele izolate din bacteriemii sau endocardite, produc *anionul superoxid* în mediul extracelular, cu efect litic asupra celulelor eucariote şi a unor specii bacteriene (de exemplu, bacteriile anaerobe).

Gelatinaza şi hialuronidaza, metaloproteaze extracelulare cu Zn, sunt implicate în distrugerea ţesuturilor şi generarea răspunsului inflamator.

Citolizina determină liza hematiilor, PMN şi macrofagelor, în special în condiţii de anaerobioză, dar exercită şi efect de bacteriocină manifestat preferenţial pe bacterii Gram pozitive,

Leziuni tisulare	LTA
	Anion superoxid extracelular
	Gelatinază
	Hialuronidază
	Citolizină
Inducerea răspunsului inflamator	Feromoni de sex
	LTA

Enterococii exprimă molecule cu rol de adezine la celulele gazdei şi de matricea extracelulară, ceea ce le permite să invadeze ţesuturile şi să formeze abcese (AS, LTA), să elibereze toxine şi factori imunomodulatori (tabelul 11).

AS este o adezină proteică codificată plasmidial care mediază contactul între o celulă receptoare şi una donoare de material genetic, facilitând transferul de material genetic (fig. 95).

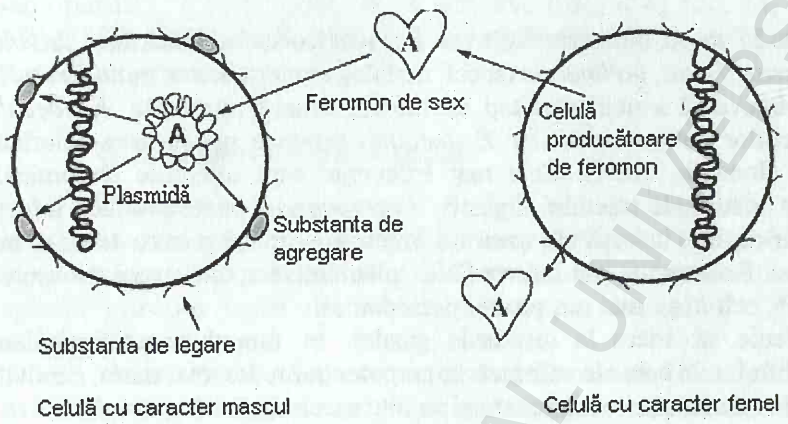


Fig. 95. Reprezentarea schematică a mecanismelor de comunicare intercelulară, bazate pe feromoni, care au loc în procesul conjugării (Murray, 1998).

AS este secretată de celula donoare, în timp ce celula receptoare secretă o substanţă de legare (BS- *binding substance*), codificată cromosomal. Complexul AS-BS are calitate de superantigen.
AS mediază de asemenea şi aderenţa enterococilor la o serie de tipuri de celule eucariote, inclusiv neutrofile şi la moleculele matricei extracelulare.

Adezinele de suprafaţă (*Enterococcus surface protein*) sunt proteine cu greutate moleculară mare identificate mai ales la tulpinile izolate din infecţii.

Feromonii de sex sunt peptide mici de semnalizare (7–8 aminoacizi) secretate în mediu de celulele receptoare de material genetic, care induc secreţia de AS de către celula donoare.

Acizii lipoteichoici (LTA) sunt adezine neproteice, care mediază aderenţa enterococilor la diferite tipuri de celule eucariote (plachete, eritrocite, limfocite, PMN, cellule epiteliale), stimulează sinteza citokinelor proinflamatorii (IL-1 β, IL-6, IL-8), PGE2, VEGF şi induc apoptoza celulei gazdă. LTA inhibă de asemenea autoliza celulelor bacteriene în prezenţa antibioticelor β-lactamice. Acest efect explică sensibilitatea redusă a enterococilor la unele antibiotice administrate parenteral (cefalosporine), care predispun la infecţiile cu enterococi şi sunt in mod considerabil asociate cu bacteriemia enterococică (Jett şi colab., 1994). Cantitatea de LTA se dublează în forma VBNC.

Unele tulpini, mai ales cele izolate din bacteriemii sau endocardite, produc *anionul superoxid* în mediul extracelular, cu efect litic asupra celulelor eucariote şi a unor specii bacteriene (de exemplu, bacteriile anaerobe).

Gelatinaza şi hialuronidaza, metaloproteaze extracelulare cu Zn, sunt implicate în distrugerea ţesuturilor şi generarea răspunsului inflamator.

Citolizina determină liza hematiilor, PMN şi macrofagelor, în special în condiţii de anaerobioză, dar exercită şi efect de bacteriocină manifestat preferenţial pe bacterii Gram pozitive,

favorizând modificarea compoziției microbiotei normale și colonizarea cu bacterii Gram negative. Genul *Enterococcus* secretă și alte bacteriocine denumite BC-48, EJ97, 1071A, 1071B, SE-K4, 4, enterocinele 226NWC și EFS2, bacteriocinele 31 și 21.

AS-48 este un antibiotic peptidic codificat plasmidial cu un spectru larg de activitate antimicrobiană față de bacterii Gram pozitive și Gram negative.

Enterococii prezintă rezistență naturală la multe grupe de antibiotice: cefalosporine, peniciline rezistente la penicilinază, monobactami, sulfonamide, sensibilitate intermediară sau rezistență la fluoroquinolone. Ampicilina are efect bacteriostatic. Enterococii sunt de asemenea rezistenți la lincosamide (clindamicină și lincomicină) și au o rezistență de nivel scăzut la aminoglicozide (streptomicină, kanamicină, gentamicină) (CMI< 500 μg/mL). Asocierea dintre un β-lactamic sau glicopeptid (care acționează asupra peretelui celular) și un aminogliozid este esențială pentru tratamentul infecțiilor grave cu enterococ, cum sunt endocarditele, datorită acțiunii sinergice a acestor antibiotice. Sinergismul nu mai acționează însă în cazul tulpinilor cu rezistență de nivel înalt la aminoglicozide (CMI> 500 μg/mL), apărută ca urmare a dobândirii prin tranfer orizontal a genelor ce codifică enzime inactivatoare ale aminoglicozidelor (tabelul 12). Rezistența dobândită este rezultatul mutațiilor ADN sau stabilizării unui fragment de ADN exogen conjugativ. La *Enterococcus* funcționează 3 sisteme de transfer conjugativ:

- plasmidele cu spectru larg de gazdă se pot transfera între tulpinile de *Enterococcus*, dar și la specii de *Staphylococcus* (*S. aureus*), *Lactobacillus* sp., *B. subtilis*. Transferul este dependent de contactul intercelular strâns pe filtrele de membrană și este ineficient în bulion. Transferul plasmidelor cu spectru larg de gazdă a fost sugerat de faptul că *Staphylococcus* și enterococii au multe gene de rezistență comune (la gentamicină, eritromicină, penicilinază);
- plasmidele cu spectru îngust de gazdă (găsite numai la *E. faecalis*), ce se transferă cu o frecvență înaltă în mediu lichid (bulion), ca răspuns la factori de *quorum sensing*, care au ca efect agregarea caracteristică și vizibilă a celulelor donoare și receptoare de material genetic;
- transpozonii conjugativi mediază transferul ADN cu o frecvență scăzută, pe filtre. Cel mai cunoscut este Tn 916, ce mediază rezistența la tetraciclină (Murray, 1990).

Tabelul 12.

Spectrul enzimelor inactivatoare ale aminoglizozidelor (după Brooks și colab., 2007).

	Aminoglicozid			
Enzima	Streptomicină	Gentamicină	Tobramicină	Amikacină
6-Adeniltransferază	+	–	–	–
3'-Fosfotransferază	–	–	–	+
6'-Acetiltransferază	–	–	+	
4'-Adeniltransferază	–	–	+	±
2'-Fosfotransferază/6'-acetiltransferază	–	+	+	+

Utilizarea frecventă a vancomicinei în tratamentul infecțiilor cu coci Gram pozitivi, ca și utilizarea unor antibiotice înrudite, ca promotori de creștere în hrana animalelor (de exemplu, avoparcina) a condus la emergența în mediul spitalicesc a enterococilor rezistenți la vancomicină (*vancomycin-resistant enterococci* - VRE).

Diferențierea enterococilor la nivel de specie este importantă pentru detectarea tipului de rezistență la vancomicină și pentru diferențierea rezistenței intrinseci (*van*C) (netransferabilă) sau dobândite (*van*A sau *van*B) (transferabilă). *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* prezintă rezistență dobândită (*van*A- rezistență de nivel înalt, CMI Van >128 μg/ml, CMI Tec ≥16 μg/ml, *van*B- CMI Van 16–64 μg/ml, CMI Tec ≤1 μg/ml, *van*C, *van*D-CMI Van 64–128 μg/ml, CMI Tec 4–8 μg/ml și *van*E), *în timp ce E. gallinarum* și *E. casseliflavus/E. flavescens* (specii producătoare de pigment galben, caracteristic) au rezistență intrinsecă, de nivel scăzut, la vancomicină, codificată de gena van C, cu valori CMI Van scăzute (2–16 μg/ml).

Cel mai studiat determinant de rezistență la vancomicină este operonul vanA, localizat pe o plasmidă autotransferabilă care conține un transpozon înrudit cu Tn*1546.*

6.2.6. Alte genuri şi specii de streptococi

Streptocococii viridans (*Str. mitis, Str. mutans, Str. sanguis* etc) sunt α-hemolitici sau nehemolitici, componenți ai microbiotei normale a tractului respirator superior. Pot ajunge în sânge prin traumatisme şi produc endocardita pe valvele cardiace anormale. Din acest motiv, în cursul intervențiilor chirurgicale la nivelul tractului respirator, gastrointestinal sau urinar, se administrează agenți antimicrobieni la persoanele care au deformări ale valvelor cardiace. *Str. mutans* sintetizează cantități mari de polizaharide din sucroză (levan, dextran) şi inițiază procesul cariogen.

Genul *Peptostreptococcus* sp. creşte numai în anaerobioză sau microaerobioză şi uneori produc hemolizine. Sunt membri ai microbiotei cavității orale, a tractului respirator superior, a tractului genital feminin, a colonului. Se poate izola din infecțiile anaerobe mixte: răni, endometrită post-partum.

Genul *Globicatella*, cu o singură specie *sanguis*, este înrudit filogenetic cu *Aerococcus* şi se aseamănă cu enterococii, dar sunt sensibili la vancomicină. Este izolat de la pacienți cu bacteriemie, cu infecții ale tractului urinar, meningită.

Genul *Lactococcus* – cu mai multe specii şi subspecii, reuneşte coci aparținând serogrupului Lancefield N, homofermentativi, asemănători cu enterococii dar nu se dezvoltă la 45 grade C. Produc bacteriemii, infecții de tract urinar (cistite), endocardită subacută, pneumonii, infecții cutanate, apendicite, abcese cerebrale.

Genul *Leuconostoc* – cu mai multe specii, cuprinde cocobacili homofermentativi, asemănători din punct de vedere al caracterelor de colonie cu streptococii *viridans,* izolați din infecții parodontice, de cateter, bacteriemii, septicemii la gazde imunodeprimate, meningite cu evoluție gravă cauzată de rezistența intrinsecă la vancomicină

Genul *Streptococcus milleri* poate produce infecții supurative, abcese cerebrale, infecții ORL, cutanate, genitale, pleuropulmonare.

Alți streptococi orali sunt agenți principali ai endocarditelor infecțioase.

Streptococii de grup D grupați în specia *S. bovis* produc adesea infecții abdominale la pacienții cu neoplazii de colon.

Genul *Vagococcus* cuprinde lactococi mobili, de grup N, izolați în cazuri rare de la pacienți cu bacteriemii, peritonite. Se prezintă sub formă de coci în perechi sau tetrade, catalazo –negativi.

Genul *Gemella* cuprinde 2 specii, cu morfologie de coci în perechi, tetrade, grămezi sau lanțuri scurte, Gram-variabili, izolați din cazuri clinice de bacteriemii la bolnavi cu endocardită, meningite, şi din lichidul sinovial al bolnavilor cu artrite.

Genul *Helcococcus* produce infecții ale plăgilor, ulcere cutanate şi mastite, infecții de chist sebaceu, infecții supraadăugate ale rănilor.

Genul *Pediococcus* produce supurații abdominale, salivă, scaun, urină, bacteriemii, septicemii, abcese abdominale, abcese hepatice, endocardite, peritonite, infecții de cateter.

Genul *Tetragenococcus* cuprinde tulpini care nu au fost izolate la om. Sunt coci grupați în perechi sau tetrade cu acțiune catalazică slabă.

Genul *Aerococcus* produce bacteriemii la bolnavi cu endocardite, infecții de tract urinar, lichid sinovial la pacienții cu artrită septică, meningite.

Genul *Alloiococcus* produce otite, bacteriemii.

Genurile *Abiotrophia* şi *Granulicatella* reunesc streptococi defectivi auxotrofi pentru vitamina B_6 şi cisteină, anterior numiți *Str. defectives, Str. adjacens* şi specii adiționale; produc cromofori; sunt PYR (+); au aspect pleomorf, sunt Gram variabili, pseudo-bacilari, izolați sau rar în lanțuri (fig. 96). Se dezvoltă doar pe medii cu factori de creştere sau ca şi colonii satelite în jurul coloniilor de *S. aureus* (fig. 97). Produc endocardite; sinuzite; afecțiuni paradontotice; osteomielite; abcese cerebrale; meningite; endoftalmite.

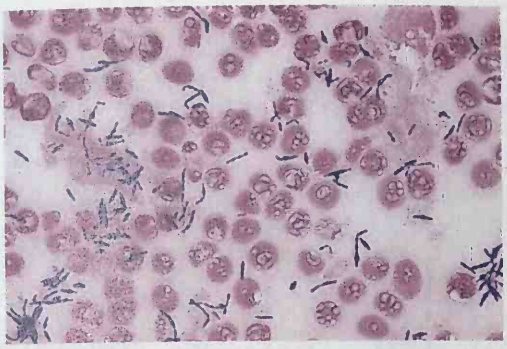


Fig. 96. Aspectul pseudobacilar al streptococilor defectivi din genul *Abiotrophia* (http://bacterioweb.univ-comte.fr/photo2detail.php?id=221).

Fig. 97. Fenomenul de satelitism – creşterea în cultură fină a streptococilor defectivi în jurul striului de cultură de *S. aureus* 25923 însămânţat pe mediu Muller Hinton cu 5% sânge de berbec (http://www.scielo.org.ar/img/revistas/ram/v38n3/3a13f1.jpg).

6.2.7. Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor streptococice presupune parcurgerea următoarelor etape:

- examinarea microscopică a frotiurilor realizate direct din produsul patologic care relevă coci Gram pozitivi, izolaţi sau grupaţi în diplo sau în lanţuri de lungimi variabile;
- izolarea agentului patogen din produsele patologice după însămânţare pe geloză sânge;
- examinarea caracterelor de colonie şi a tipului de hemoliză; se recomandă utilizarea gelozei cu 5% sânge de berbec şi incubarea în anaerobioză sau înţeparea mediului în profunzime cu ansa, pentru a favoriza dezvoltarea în anaerobioză. Geloza cu sânge de berbec trebuie preparată folosind un mediu de bază cu conţinut scăzut în glucoză sau fără glucoză (*Tryptic Soy Agar – TSA*), deoarece fermentarea glucozei şi acidifierea ulterioară a mediului inhibă producerea hemolizinelor. Geloza cu sânge de berbec revelează hemoliza produsă de *Haemophilus* sp. şi inhibă hemoliza produsă de *E. faecalis var. zymogenes* care poate apărea pe medii cu hematii de altă provenienţă. Pentru a uşura observarea β-hemolizei, pe striul iniţial de însămânţare se poate depune un disc de SXT sau de bacitracină de concentraţie mică (0.02–0.05 UI). Deoarece foarte multe specii care ocupă acelaşi habitat sunt sensibile la SXT, iar *Str. pyogenes* este rezistent, în jurul discului de biseptol vor creşte doar coloniile β-hemolitice care se evidenţiază mai uşor. De asemenea, orice zonă de inhibiţie apărută în jurul discului de bacitracină de concentraţie joasă este revelatoare pentru *Str. pyogenes*. Pentru identificarea *Str. pyogenes* nu se folosesc discurile de bacitracină utilizate în antibiograma clasică cu încărcătură de 10 UI. După o primă citire realizată la 18 ore de incubare, plăcile sunt incubate în continuare şi citite la 48 de ore pentru a permite dezvoltarea coloniilor mici (0.5–2 mm diametru), β-hemolitice. Coloniile mici, chiar dacă aglutinează cu serul anti-A, nu vor fi raportate ca *Str. pyogenes*. În schimb, prezenţa coloniilor mari de *Str. pyogenes* trebuie raportată semicantitativ (colonii rare, +, ++ sau +++). În general, în faringitele acute, cultura de *Str. pyogenes* obţinută din exsudatul faringian este masivă, ocupând întreaga suprafaţă a mediului, în timp ce la purtători, numărul de colonii este < 20 (WHO, 2003);
- streptococii β hemolitici din grupul serologic A sunt sensibili la bacitracină (diametrul zonei de inhibiţie a creşterii este mai mare de 10 mm) (fig. 98) şi rezistenţi la SXT. Streptococii din serogrupurile C, F şi G sunt rezistenţi la bacitracină (rezistenţă nativă) şi sensibili la SXT;
- testul catalazei este util pentru diferenţierea streptococilor catalazo-negativi de stafilococii catalazo-pozitivi;
- testul creşterii pe medii cu 6,5% NaCl util pentru identificarea enterococilor care sunt halotoleranţi;
- testul la optochin. *Str. pneumoniae* este sensibil la optochin care determină o zonă de inhibiţie a creşterii mai mare de 16 mm (fig. 99);
- testul sensibilităţii la dezoxicholat de Na 10% pozitiv pentru *Str. pneumoniae* (fig. 100);

– identificarea biochimică cu ajutorul galeriilor de indentificare biochimică tip API 20 Strep (fig. 101), Rapid ID 32 Strep System, sisteme automate de tip Vitek I, Vitek II, Phoenix etc., este utilă pentru diagnosticul streptococilor beta-hemolitici non A, non B, enterococilor şi streptococilor viridans.

Fig. 98. Streptococi β-hemolitici sensibili la bacitracină (cadran stânga sus) şi rezistenţi la bacitracină (cadran dreapta sus).

Fig. 99. Streptococi α-hemolitici sensibili la optochin (stânga).

Fig. 100. Str. pneumoniae. Testul pozitiv la bilă după adăugarea de deoxicolat Na 10% (după Todar, 2008).

Fig. 101. Aspectul galeriei biochimice API 20 Strep pentru *Str. pyogenes.*

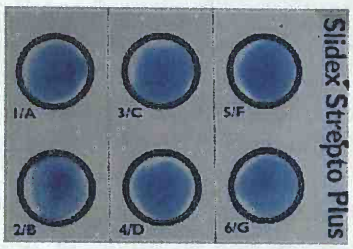


Fig. 102. Testul latex-aglutinării pentru evidenţierea serogrupului streptococilor β-hemolitici.

Diagnosticul imunologic se poate realiza prin:

– reacţii de latex – aglutinare pe lamă, rapide şi economice, cu o bună sensibilitate şi specificitate pentru determinarea serogrupului streptococilor β-hemolitici (cu ajutorul truselor cu antiseruri anti A, B, C, F şi G) (fig. 102) sau antigenelor capsulare pneumococice, din cultură sau direct din produsul patologic;
– testul ASLO – determinarea titrului de anticorpi anti-SLO;
– teste imunoenzimatice (ELISA).

Testarea sensibilităţii la antibiotice nu este necesară pentru streptococii β-hemolitici cu colonii mari de grup A, B, C şi G, pentru care antibioticul de elecţie este penicilina. La pacienţii alergici la penicilină cu risc scăzut de anafilaxie se recomandă cefazolinul, iar pentru cei cu risc înalt, eritromicina sau clindamicina, care însă trebuie testate în prealabil prin metoda disc difuzimetrică, în cazul streptococilor de grup B. La aceştia rezistenţa inductibilă la clindamicină poate fi detectată prin testul dublei difuzii, prin plasarea alăturată a discurilor de eritromicină şi clindamicină (fig. 103).

Streptococii β-hemolitici cu colonii mici de grup A, B, C şi G (din grupul *anginosus*, anterior *milleri*) sunt trataţi ca streptococi viridans (care includ şi grupurile *bovis, mutans*, *salivarius* şi *mitis*), pentru care se recomandă efectuarea antibiogramei pe mediu Müller Hinton cu 5% sânge de berbec. Testarea difuzimetrică nu este adecvată pentru penicilină sau ampicilină, iar în cazul în care streptococii viridans provin din cavităţi sterile ale organismului, aceste antibiotice trebuie testate prin metode cantitative care să permită stabilirea valorii CMI. În cazul în care valorile CMI indică o tulpină cu sensibilitate intermediară, în terapie trebuie asociat un aminoglicozid, pentru a asigura efectul bactericid.

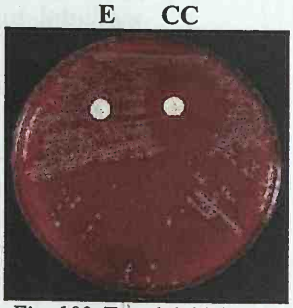


Fig. 103. Testul dublei difuzii care evidenţiază rezistenţa inductibilă la clindamicină în prezenţa eritromicinei.

În ceea ce priveşte *Str. pneumoniae,* mecanismele rezistenţei la peniciline constau în alterarea PBPs, care determină reducerea afinităţii pentru această clasă de antibiotice. Rezistenţa poate fi de nivel scăzut, convenţional numită „intermediară"(I), sau de nivel înalt, numită rezistenţa

clinică totală (R). În meningitele pneumococice se utilizează cu succes doze mari de peniciline (până la 24 de milioane de doze pe zi în cazul tulpinilor cu CMI de 4 μg/ml) sau alte antibiotice β-lactamine (cefotaxim, ceftriaxonă, meropenem), însă numai după determinarea valorii CMI (CLSI, 2010). Izolatele din LCR trebuie obligatoriu testate şi pentru sensibilitate la vancomicină, prin metode cantitative care permit stabilirea CMI (CLSI, 2010). Pentru izolatele non-LCR se pot administra amoxicilină, amoxicilină cu acid clavulanic, cefalosporine de generația a III-a şi a IV-a şi tetracicline.

Macrolidele, lincosamidele şi streptograminele (MLS) sunt antibiotice care acționează asupra mecanismelor sintezei proteinelor inhibând inițierea legării ARNm la nivelul ribosomilor. Sunt cunoscute două mecanisme prin care se produce apariția rezistenței la aceste antibiotice: unul numit MLSB, rezultat prin dobândirea genei specifice de rezistență *erm* (*erythromycin ribosomal methylation gene*), prin modificarea țintei, iar celălalt prin dobândirea genelor pentru sistemul de eflux (*mef*E). Antibiograma se realizează pe mediu Müller Hinton cu 5% sânge de berbec utilizând oxacilina pentru interpretarea sensibilității la penicilină.

Pentru enterococi, testarea sensibilității la antibiotice se realizează pe mediu Müller Hinton. Dintre antibioticele β-lactamice, se testează penicilina sau ampicilina, sensibilitatea la penicilină fiind extrapolată pentru sensibilitatea la ampicilină, amoxicilină, piperacilină, amoxicilină cu acid clavulanic, piperacilină tazobactam, ampicilină sulbactam si imipenem. Rezistența la penicilină sau ampicilină poate fi datorată în cazuri foarte rare producerii β-lactamazei, care se evidențiază prin testul rapid al hidrolizei nitrocefinului, deoarece enzima fiind produsă în cantitătăți mici nu poate fi detectată prin metoda difuzimetrică. De asemenea, enterococii pot apărea sensibili *in vitro* la trimetoprim-sufametoxazol (biseptol), însă *in vivo* devin rezistenți la acest antibiotic, deoarece pot utiliza folați exogeni disponibili în organismul gazdă pentru sinteza bazelor azotate, a căror producere este inhibată de acest antibiotic.

Bibliografie selectivă

1. Allen S. H., Brennan-Benson P, Nelson M., Asboe D., Bower M., Azadian B., Gazzard B., Stebbing J. 2003. Pneumonia due to antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in the HAART era Postgrad Med J; 79:691–694
2. AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A. F. M., Verhoef, J., Snippe, H. 1995. *Streptococcus pneumoniae: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines.* Microbiological Reviews. 59: 591–603.
3. Arthur M, Courvalin P.1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother; 37:1563
4. Artz, A. S., Ershler, W. B., Longo, D. L. 2003. *Pneumococcal Vaccination and Revaccination of Older Adults.* Clinical Microbiology Reviews. 16: 308-318.
5. Buiuc D., Neguț, M. 2008. Tratat de Microbiologie medicală, ed. a II-a, Ed. medicală, Bucureşti
6. http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/photo2detail.php?id=221
7. http://www.scielo.org.ar/img/revistas/ram/v38n3/3a13f1.jpg
8. http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16
9. Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1
10. Jawetz, Melnick şi Adelberg. 2007. 24th Edition of Medical Microbiology, McGraw-Hill Companies, http://www.accessmedicine.com
11. Jedrzejas, M. J. 2001. *Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function.* Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65: 187–207.
12. Jett, B. D., Huycke M. M., Gilmore, M. S. 1994. Virulence of enterococi . Clin. Microbiol. Reviews. 7 (4): 462–478.
13. Kayaoglu, G., Ørstavik D. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 15(5):308–320
14. Murray, Barbara E. 1990. The Life and Times of the *Enterococcus* . Clin. Microbiol. Reviews. 3 (1):46-65.
15. Murray, Barbara E. 1998. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. Emerging Infectious Diseases. 4: 1.
16. Österlund, A., Engstrand, L. 1997. An intracellular sanctuary for *Streptococcus pyogenes* in human tonsillar epithelium – studies of asymptomatic carriers and in vitro cultured biopsies. *Acta Otolaryngol* 117, 883–888
17. Silva-Costa, C., Ramirez, M., Melo-Cristino, J. 2006. Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal Clinical Microbiology & Infection, 12 (6): 513–518
18. Stoolmiller, A.C., Dorfman, A. 1969. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus.* J. Biol. Chem., 244, 236–346
19. Swedo SE, Leonard HL, Mittleman BB, et al. 1997. Identification of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections by a marker associated with rheumatic fever. Am J Psychiatry; 154:110–112
20. Todar, K. 2008.Todar's Online Textbook of Bacteriology – www.textbookofbacteriology.net
21. WHO. 2003. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, 2nd Edition WW.

6.3. Coci piogeni Gram negativi de importanţă medicală – Familia Neisseriaceae

6.3.1. Genul *Neisseria*

Familia *Neisseriaceae* cuprinde coci Gram negativi, strict aerobi, care aparţin următoarelor genuri: *Neisseria, Kingella, Eikenella, Simonsiella* şi *Alysella.*

Tabelul 13.

Caracterele biochimice ale speciilor genului *Neisseria* şi *Moraxella catarrhalis* (după Brooks şi colab., 2007).

		Fermentarea glucidelor				
	Creştere pe mediu Thayer-Martin modificat (cu vancomicină, colistin, amfotericină), mediu Martin-Lewis sau New York City	Glucoza	Maltoza	Lactoza	Zaharoza sau fructoza	DN-aza
N. gonorrhoeae	+	+	–	–	–	–
N. meningitidis	+	+	+	–	–	–
N. lactamica	+	+	+	+	–	–
N. sicca	–	+	+	–	+	–
N. subflava	–	+	+	–	±	–
N. mucosa	–	+	+	–	+	–
N. flavescens	–	–	–	–	–	–
N. cinerea	±	–	–	–	–	–
N. polysaccharea	±	+	+	–	–	–
N. elongata	–	–/w	–	–	–	–
M. catarrhalis	–	–	–	–	–	+

* Celulele colorate diferit corespund testelor utilizate pentru diferenţierea speciilor de *Neisseria* de importanţă clinică.

Genul *Neisseria* cuprinde mai multe specii comensale pe mucoasa tractului respirator superior (tabelul 13), dintre care numai două specii sunt patogene, şi anume:

– *N. gonorhoeae* (gonococ) (agentul gonococozei, blenoragiei sau gonoreei, cu complicaţii grave la femei), cu o prevalenţă mare in populaţie, dar care rareori produce infecţii letale;

– *N. meningitidis* (meningococ) (agentul meningitei cerebrospinale), cu o prevalenţă scăzută, dar infecţiile netratate sunt adeseori letale.

Cele două specii au omologie la nivel de ADN de 70–80%, dar produc entităţi clinice distincte.

Celulele de *Neisseria* sunt grupate în perechi (diplococi sub formă de boabe de cafea) (fig. 104).

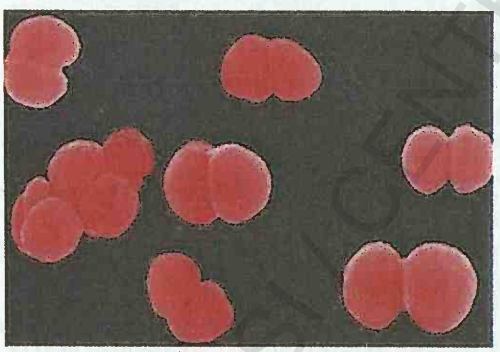


Fig 104. Imagine de microscopie electronică de scanning care evidenţiază diplococi de *Neisseria gonorrhoeae* (student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab16/dkngon.html)

Fig. 105. Aspectul culturii de *N. meningitidis* pe geloză sânge (www.visualphotos.com/image/2x4140933/meningitis_bacteria_neisseria_meningitidis).

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ

Coloniile (1–5 mm) sunt transparente sau opace, convexe, mucoide, nepigmentate şi nehemolitice (fig. 105). *N. flavescens, N. subflava* şi *N. lactamica* produc un pigment galben. *N. sicca* formează colonii opace, fine, rugoase. *Moraxella catarrhalis* poate forma colonii opace nepigmentate sau roz-gri.

Neisseria creşte în condiţii aerobe, deşi unele specii cresc şi în anaerobioză. Cele mai multe specii metabolizează glucidele pe cale oxidativă cu acidifierea mediului, fără producere de gaz. Unul dintre principalele teste biochimice utile pentru identificarea acestora este reacţia oxidazei (în prezenţa tetrametil-parafenilenediaminei hidrochlorice), totdeauna pozitivă. Neisseriile necesită medii bogate de cultivare, cu adaos de sânge tratat termic, hemină, proteine animale şi incubare în atmosferă de CO_2 (5%).

Factorii de virulenţă ai speciilor patogene de *Neisseria* sunt reprezentaţi de:
- pili, prin intermediul cărora *Neisseria* aderă la celulele epiteliale neciliate (fig. 106);
- LPS;
- capsula cu efect antifagocitar, la *N. meningitidis;*
- secreţia proteazelor care clivează IgA.

Antigenele membranei externe la *N. gonorhoeae* şi *N. meningitidis* sunt reprezentate de proteine cu funcţie de porine, LPS şi lipoproteine. Prin fenomenul variaţiei de fază* a antigenelor suprafeţei celulare (pilina, LPS, proteinele membranei externe) se produce comutarea între fenotipuri.

* Variaţia de *fază* înseamnă că o structură dată este sau nu este produsă. Variaţia *antigenică* semnifică faptul că aceeaşi structură se produce în variante biochimice diferite.

LPS este o moleculă incompletă, deoarece îi lipseşte regiunea polizaharidică externă, motiv pentru care este numită lipooligozaharid (LOS), fiind alcătuită din oligozaharidul regiunii intermediare şi lipidul A. Toxicitatea infecţiei gonococice se datorează efectelor endotoxice ale LOS.

Factorul major al virulenţei la *N. meningitidis* şi *N. gonorrhoeae* este variaţia antigenică a apendicelor celulare, denumite fimbrii. La *Neisseria*, pentru aceste structuri s-a păstrat denumirea de *pili* (fig. 107). Pilii sunt cele mai importante adezine de natură proteică, prin intermediul cărora celulele bacteriene aderă la suportul celular eucariot: celule epiteliale, endoteliale, fagocite.

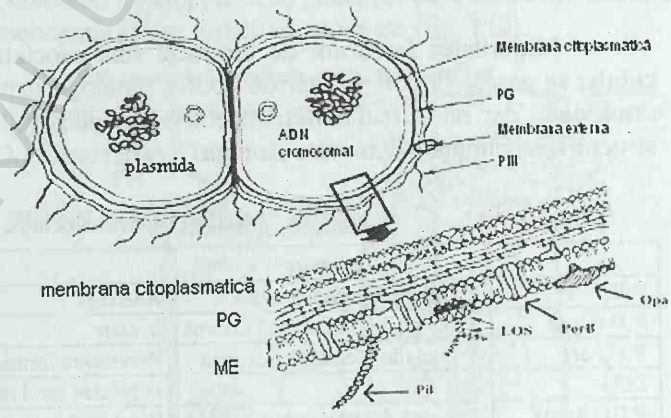


Fig. 106. Structura schematică a celulelor de *N. gonorrhoeae* (peretele celular, cromosomul bacterian, plasmidele criptice şi structurile de membrană externă – pili, LOS, porine (PorB) şi proteine de aderenţă Opa) (Unemo şi colab., 2004).

Fig. 107. Imagine electrono-optică, prin tehnica coloraţiei negative, a celulelor de *Neisseria*, cu dispoziţia pericelulară a fimbriilor (textbookofbacteriology.net/.../N.gonorrhoeae.jpg.).

In vitro, N. meningitidis şi *N. gonorrhoeae* aderă la celulele epiteliale ale tractului urinar uman şi ale unui număr limitat de specii animale. Omul este singurul rezervor natural de infecţie pentru aceste bacterii. Alte adezine cu rol în virulenţă sunt proteinele membranei externe.

BUCHAREST UNIVERSITY CENTRAL LIBRARY

Traversarea epiteliului. După ataşarea de polul apical al celulelor epiteliale, cocii sunt internalizaţi prin mecanismul endocitozei mediate de receptori (fig. 108). Este posibilă multiplicarea intracelulară, după care cocii traversează citoplasma şi se eliberează prin exocitoză în spaţiul subepitelial (fig. 109).

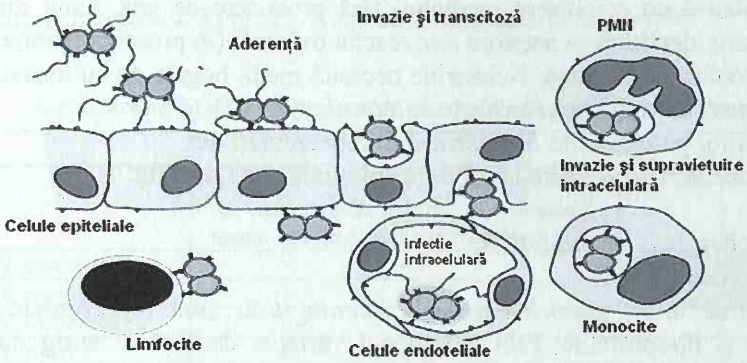


Fig. 108. Mecanismul producerii infecţiilor diseminate de către neisserii: aderenţa la celulele epiteliale, mediată de proteine *opa* (proteine ale membranei cu rol în procesul de aderenţă), este urmată de traversarea epiteliului şi pătrunderea în torentul sanguin (după Schneider şi colab., 2006).

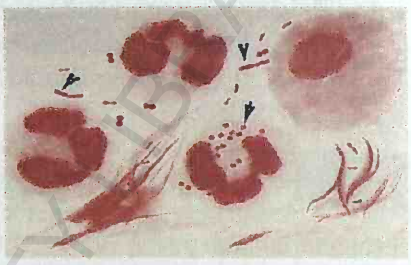


Fig. 109. N. gonorrheae. Săgeţile indică forme pleomorfe, pseudobacilare şi diplococi intracelulari (Nowicki et al., 1999)

6.3.1.1. N. gonorrhoeae* nu este niciodată constituent al microbiotei normale. Este un coc Gram negativ, frecvent intracelular in PMN (fig. 95), cu diametrul cuprins între 0,60–1,0 μm, sensibil la variaţii de temperatură, uscăciune, UV. Se cultivă pe medii care conţin hemoglobină, NAD, extract de levuri, la 35–36°C, în atmosferă de 3–10% CO_2.

*Neisser (1879) a identificat *N. gonorrhoeae* în exsudatul pustular numit "Gonorrhoea" (galen – scurgere). Paracelsus (1530) considera că gonoreea este un simptom al sifilisului.

Majoritatea factorilor de virulenţă sunt asociaţi cu peretele celular (tabelul 14). În peretele celular se găsesc lipooligozaharide (LOS), omologe structural cu LPS, pentru că au o structură bazală ramificată, dar nu au subunităţi repetitive antigenice de tip O. În timpul creşterii, bacteria elimină structuri membranare denumite „muguri", care conţin LOS.

Tabelul 14.

Factorii de virulenţă la *N. gonorrhoeae.*

	Denumire	*Rol*
PilE	Proteina majoră fimbrială	Aderenţă
P.II (Opa)	Proteină din membrana externă	Invazie
P.I (Por)	Porină din membrana externă	Prevenirea formării de fagolizosomi şi/sau inhibarea cascadei oxidative
LOS		Inducerea unui răspuns inflamator prin eliberarea TNF
P.III (Rmp)	Proteină din membrana externă	Blochează activitatea bactericidă a anticorpilor anti- P.I şi LOS
Tbp1 and Tbp2	Receptori de transferină	Preluarea Fe
Lbp	Receptori de lactoferină	Preluarea Fe

LOS este un factor major de virulenţă deoarece:

- stimulează producerea de TNF şi recrutează neutrofilele la locul infecţiei;
- conferă rezistenţă la acţiunea bactericidă a serului, prin faptul că *N. gonorrhoeae* poate utiliza acidul N-acetil neuraminic pentru a-şi sializa propriul LOS generând apariţia unei microcapsule;
- prezintă omologie cu antigenele de grup sangvin, ceea ce induce imunotoleranţa gazdei.

N. gonorrhoeae poate prelua Fe din transferina umană (prin intermediul a 2 receptori de transferină (*Tbp1* şi *Tbp2* şi din lactoferina umană (receptor de lactoferină – *Lbp*).

Cele două proteaze clivează IgA_1 din secreţia mucoasei, iar regiunile Fab ale anticorpilor clivaţi se fixează pe suprafaţa celulei bacteriene blocând funcţiile biologice ale Ig mediate de Fc.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Antigenele de suprafață ale *N. gonnorhoeae* (pilina, LPS, Opa – proteină a membranei externe cu rol de adezină) suferă *variație antigenică de fază*. Variația antigenică periodică favorizează evaziunea față de apărarea gazdei, ceea ce facilitează infecția repetată. Variantele antigenice ale pilinei, Opa și LOS apar cu o frecvență de $1/10^3$, extrem de rapidă pentru populațiile bacteriene. Gonococii pot să inactiveze total sau parțial gena codificatoare a pilinei și să o înlocuiască cu o altă genă sau cu o parte a altei gene.

Un alt mecanism al evaziunii sistemului imunitar este *mimetismul molecular*: prezența pe suprafața gonococilor și a celulelor epiteliale ale uretrei, a unor molecule asemănătoare din punct de vedere antigenic. De exemplu, *in vivo*, gonococii exprimă molecule particulare de LOS esterificate cu acid sialic, asemănătoare glicosfingolipidelor* membranare ale celulelor epiteliale și nu sunt recunoscute de sistemul imunitar al gazdei. Aceste celule sunt rezistente la factorii serici (anticorpi, complement, proteine litice), dar incapabile să depășească suprafața mucoasei.

* Galactoza terminală a glicosfingolipidelor membranare este adeseori conjugată cu acidul sialic (9 atomi de C). Gonococii nu sintetizează acidul sialic, dar sintetizează sialil-transferaza, ce catalizează sializarea galactozei terminale a LOS gonococic.

Variația antigenică poate să genereze molecule de LPS nesializate. Tulpinile bacteriene cu LPS nesializate sunt aderente și invazive pentru celulele epiteliale ale mucoasei. Explicația este că LPS sializate sunt asemănătoare moleculelor de suprafață ale celulelor eucariote și sunt tolerate de efectorii imunitari. Astfel, celulele bacteriene cu LPS sializate pot supraviețui în mediul extracelular pentru că nu sunt recunoscute de sistemul imunitar, iar cele cu LPS nesializate sunt invazive, pătrund în celulele epiteliale și scapă acțiunii efectorilor imunitari.

Gonococii conțin câteva plasmide, dintre care unele codifică sinteza β-lactamazei și conferă rezistență la peniciline. Plasmidele se transmit prin conjugare.

N. gonnorhoeae este o cauză majoră a infecțiilor cu transmitere sexuală. Produce în special infecția tractului urogenital – *infecția gonococică simplă*, cu colonizarea mucoasei uretrale la bărbat (uretrite) și a endocervixului și uretrei la femeie (uretrite, cervicite). *N. gonorhoeae* reprezintă a doua cauză majoră a uretritei după *Chlamydia trachomatis*. La ambele sexe poate produce forme de infecție ano-rectală sau faringiană, conjunctivite, gonococemie și/sau infecții diseminate (fig. 110).

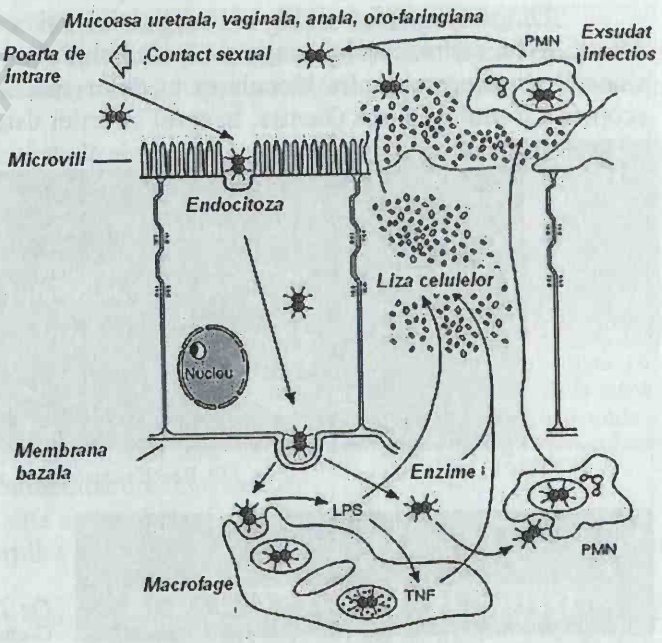


Fig. 110. Ilustrarea schematică a mecanismului patogenezei *N. gonorrhoeae*: aderența la epiteliul neciliat columnar și la microvili, mediată de fimbrii (pili de tip 4-N-metilfenilalanina) și de proteine *opa (proteine ale membranei cu rol în procesul de aderență)* (după Schneider și colab., 2006).

Din punct de vedere clinic, gonoreea se prezintă ca o infecție supurativă la nivelul uretrei, cervixului, rectului, faringelui și conjunctivei, simptomatică în special la bărbați (indurație, edem, hipertermie, durere locală, senzație de arsură, în special după micțiune). La femei, 50% din cazuri sunt asimptomatice, iar endocervicita se manifestă prin scurgere vaginală și uneori, disurie.

Fig. 111. Leziuni cutanate la un pacient cu diseminare sistemică a *N. gonorrhoeae* (www.lib.uiowa.edu/hardin/MD/cdc/gonorrhea2.html).

Infecția poate evolua ascendent, prin continuitate producând la bărbați prostatite, orhite, proctite, epididimite iar la femei, salpingite, ovarite, ultimele rezultate prin autoinoculare din scurgerea cervicală, artrite, dermatite, endocardite, meningite. La femei, boala inflamatorie pelvică poate fi urmată în 15% din cazuri de instalarea sterilității. Rareori, infecția gonococică este diseminată sub forma unei septicemii, a erupției eritematoase (*rash*) sau a artritei (fig. 111).

O astfel de infecție diseminată este produsă de tulpinile cu sensibilitate înaltă la penicilină, iar pentru creștere necesită aportul exogen de arginină, hipoxantină și uracil (Ison și Robertson, 1999).

La nou-născuți poate produce infecții oftalmice grave *(ophthalmia neonatorum)* (cu orbire prin desprinderea sau perforarea corneei), ce pot fi prevenite prin instilarea conjunctivală a soluției de $AgNO_3$ sau a antibioticelor imediat după naștere.

Gonococii izolați din probele clinice sunt piliați. Prin cultivare pe medii neselective, formează colonii mai mari, iar celulele își pierd pilii.

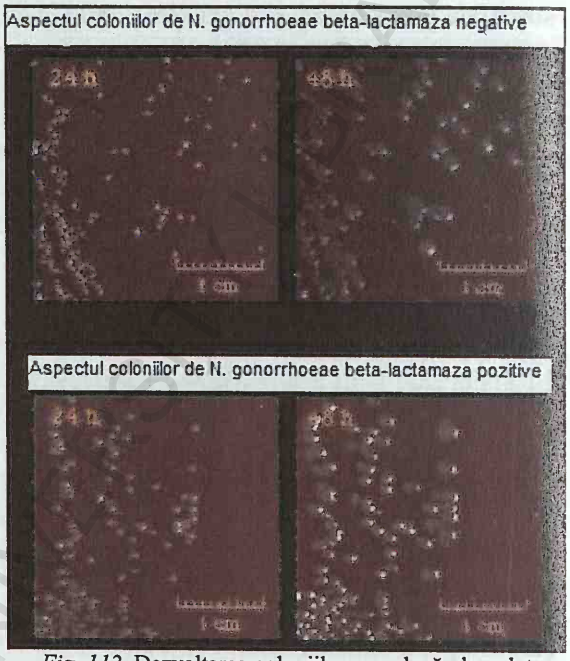


Fig. 112. Dezvoltarea coloniilor pe geloză-chocolat la 24 și respectiv 48 de ore. Se observă că tulpinile producătoare de β-lactamază formează colonii mai mari la 24 de ore, comparativ cu tulpinile sensibile.

Diagnostic (fig. 112–114). Puroiul și secrețiile din uretră, cervix, conjunctivă sau lichidul sinovial se folosesc pentru inocularea mediilor speciale în scopul izolării și pentru analiza microscopică a frotiului colorat Giemsa. În cazul infecției sistemice, *Neisseria* se cultivă din proba de sânge.

Fig. 113. Reacția catalazei și oxidazei (pozitive).

Fig. 114. Profilul biochimic al speciei *N. gonorrhoeae* (C-control, G-glucoza, M- maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *N.gonnorhoeae* (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

În serul pacienților cu infecție gonococică crește titrul anticorpilor serici specifici, iar în secreția mucoasă crește cantitatea de sIgA. Totuși, după infecție *imunitatea nu este protectoare* și de

aceea infecțiile multiple sunt frecvente. Absența imunității protectoare se datorează atât heterogenității antigenice a agentului infecțios, cât și timpului de înjumătățire foarte scurt al anticorpilor din secreția mucoasă, deoarece anticorpii serici au efect protector minim al mucoaselor.

Nu există un *vaccin* protector față de infecția gonococică, datorită variației biochimice a antigenelor pe care trebuie să le conțină preparatul vaccinal. Vaccinurile polizaharidice nu stimulează un răspuns imun protector, datorită imunogenității scăzute sau datorită asemănării cu resturile de acid sialic ale țesutului uman.

N. gonnorhoeae se transmite exclusiv prin contact sexual, de la bărbați și femei asimptomatici. După un singur contact sexual cu un partener infectat, riscul infecției este de 20–30%.

Tratamentul de elecție este reprezentat de cefalosporine de generația a III-a sau fluorochinolone asociate cu doxiciclina sau eritromicina, această schemă fiind eficientă și în cazurile de infecție cu *Chl. trachomatis*.

CLSI recomandă realizarea antibiogramei pe mediu GC (care conține cisteină, guanină, tiamină, APAB, cocarboxilază, NAD, adenină, glutamină, glucoză, nitrat feric). În general gonococii sunt sensibili la antibioticele recomandate de CLSI, singurele antibiotice pentru care s-a raportat sensibilitate diminuată *in vitro* fiind cefmetazol, cefotetan, cefoxitin și spectinomicina (CLSI, 2009).

6.3.1.2. *N. meningitidis* este saprobiontă pe mucoasa tractului respirator superior uman (omul este singura gazdă naturală pentru aceste microorganisme patogene). Meningococii saprobionți sunt totdeauna necapsulați, dar au apendice piliare, iar cei invazivi sunt *capsulați* și *piliați*. Tulpinile *capsulate* pot să producă meningita (inflamația meningelui la nivelul creierului și măduvei osoase) cu mortalitate de 50% la copiii de 6–1 luni.

Transmiterea se face pe cale aeriană, iar evoluția este endemică în Europa, unde numărul de cazuri crește în timpul iernii, cele mai frecvente fiind serogrupurile B și C și epidemică în Africa, centura de meningită fiind situată între cele două tropice, iar serogrupul A este cel mai frecvent.

Pe baza variației compoziției *polizaharidului capsular*, tulpinile capsulate de *N. meningitidis* au fost împărțite în *13 serogrupuri*. Unele serogrupuri (serogrupul B) au omologie față de un polizaharid al neuronilor SNC. Serogrupurile A, C, Y și W 135 intră în componența vaccinului față de meningita bacteriană.

La pacienții cu infecție activă, antigenele de meningococ se găsesc în sânge și în LCR.

Celulele bacteriene se fixează pe celulele epiteliale ale nazofaringelui prin intermediul pililor care proemină la suprafața polizaharidului. Pierderea capacității asamblării pililor împiedică aderența meningococilor capsulați la celulele epiteliale.

Tulpinile patogene depășesc bariera epitelială și trec în sânge, producând bacteriemie. La copiii nou-născuți și adolescenți, bacteria poate disemina în sânge determinând septicemii, cu forma *cea mai gravă de purpura fulminans*, sau sindrom infecțios sever, însoțit de leziuni necrotice și meningită (fig. 115).

Fig. 115. Fetiță de 4 luni cu gangrenă a degetelor de la mână cauzată de meningococemie (www.cdc.gov/meningitis/about/photos.html., 1965).

Cea mai comună complicație a bacteriemiei este *meningita*, cu manifestări clinice care debutează brusc (dureri de cap, vomă și comă în câteva ore).

O infecție asimptomatică a nazofaringelui evoluează în bacteriemie și meningită, probabil, ca rezultat al activării unei gene sau dobândirii prin conjugare a unei gene codificatoare a unui factor de virulență. Anticorpii specifici față de varianta antigenică capsulară sau piliară sunt protectori. În prezența anticorpilor specifici, cu funcție opsonizantă, meningococii sunt fagocitați.

Diagnosticul de laborator. N. meningitidis este un microorganism foarte sensibil la rece și la desicare, se dezvoltă la 37°C în prezența CO_2 după 48 de ore, pe medii bogate (fig. 116–117). Proba de sânge sau de LCR este folosită ca inocul pentru cultivarea *N. meningitidis*, dar și pentru examinarea frotiului colorat Giemsa. Tamponul nazofaringian servește pentru determinarea stării de purtător. Anticorpii anti-polizaharid capsular se determină prin reacții de aglutinare pasivă a particulelor de latex sau a hematiilor.

Fig. 116. Dezvoltarea coloniilor pe geloză-chocolat cu factori de creştere la 24 şi respectiv 48 de ore.

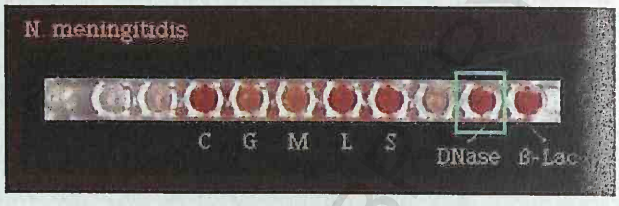


Fig. 117. Profilul biochimic al speciei *N. menigitidis* (C-control, G-glucoza, M- maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) Diagnosticul de laborator al infecţiilor cu *N.meningitidis* (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

Epidemiile de meningită meningococică apar în aglomerări umane (tabere militare, pelerinaje). În perioadele interepidemice, proporţia purtătorilor de meningococi în nazofaringe nu depăşeşte 30%, iar în timpul epidemiilor, proporţia purtătorilor atinge 80%. Numărul cazurilor de meningită clinică este proporţional cu numărul purtătorilor.

Testarea sensibilităţii la antibiotice prin metoda difuzimetrică se realizează pe mediu Müller Hinton cu adaos de 5% sânge de berbec. Tratamentul de elecţie este reprezentat de β-lactamice (în special cefalosporine de generaţia a treia sau cloramfenicol la persoanele alergice). *N. meningitidis* are sensibilitate redusă la peniciline (care, conform recomandărilor CLSI nu se testează difuzimetric), iar în plus, penicilinele nu traversează bariera hematoencefalică indemnă. Pentru chimioprofilaxia indivizilor din anturajul direct al bolnavului se utilizează rifampicina, aztitromicina, tetraciclinele, fluorochinolonele, biseptolul (CLSI, 2009). Pacienţii cu meningită sunt o sursă neglijabilă de infecţie. Infecţia repetată cu *N. meningitidis* este rară, deoarece imunitatea specifică este protectoare şi variaţia antigenică a polizaharidului capsular este foarte limitată.

6.3.1.3. Alte specii de Neisseria

N. lactamica, specie rezidentă a mucoasei nazo-faringiene la 3–40% dintre indivizi, în special copii, este rareori implicată în etiologia proceselor infecţioase, însă cunoaşterea caracterelor de laborator este importantă deoarece creşte pe mediile selective utilizate pentru cultivarea neisseriilor patogene (mediul Thayer-Martin modificat). Spre deosebire de celelalte specii de *Neisseria, N. lactamica* fermentează lactoza (tabelul 12, fig. 118).

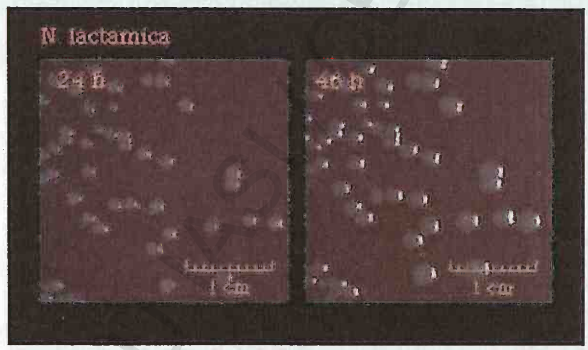


Fig. 118. Aspectul coloniilor şi profilul biochimic al speciei *N. lactamica* (C-control, G-glucoza, M-maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

N. sicca, N. subflava, N. cinerea, N. mucosa şi *N. flavescens* colonizează nazo-faringele, fiind doar rareori implicate în etiologia proceselor infecţioase.

N. cinerea se aseamănă morfologic şi biochimic (reacţia hidroxiprolil-aminopeptidază pozitivă) cu *N. gonorrhoeae,* dar este sensibilă la colistin (fig. 119, 120).

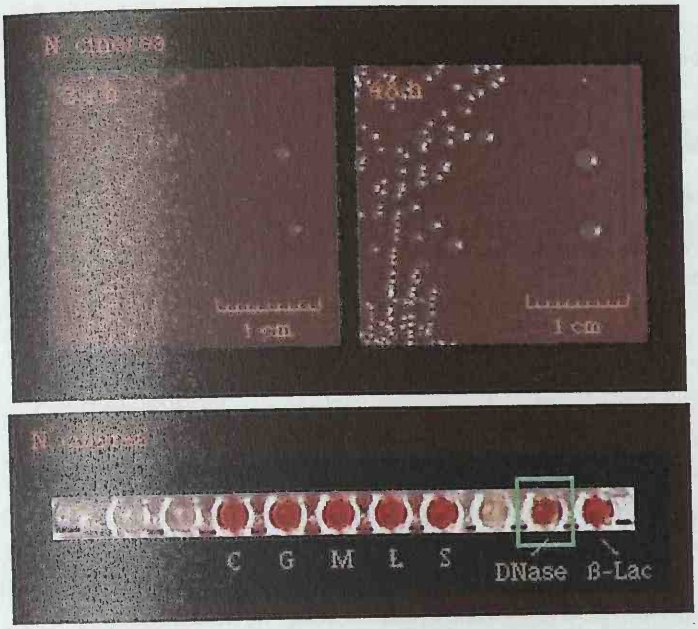


Fig. 119. Aspectul coloniilor şi profilul biochimic al speciei *N. cinerea* (C-control, G-glucoza, M- maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

Fig. 120. Sensibilitate la colistin, spre deosebire de *N. gonorrhoeae, N. meningitidis* şi *N. lactamica*, care sunt rezistente

6.3.2. *Moraxella catarrhalis* (anterior *Branhamella / Neisseria catarrhalis*) face parte din microbiota normală a tractului respirator superior la 40–50% dintre copiii şcolari, la care poate produce bronşite, pneumonii, sinuzite, otite medii şi conjunctivite, ca şi infecţii la pacienţii imunodeprimaţi. Majoritatea tulpinilor de *M. catarrhalis* izolate din contexte clinice relevante sunt producătoare de β-lactamază. *M catarrhalis* se poate diferenţia de celelalte neisserii prin absenţa fermentării zaharurilor şi prin producerea DN-azei (fig. 121). De asemenea, produce butirat-esterază, caracter care stă la baza unui test rapid, fluorimetric de identificare.

6.3.3. *Kingella denitrificans* (diplococi/icocobacili/bacili Gram negativi) poate fi izolată pe mediile folosite pentru cultivarea *N. gonorrhoeae,* profilul biochimic fiind de asemenea similar (fig. 122), iar la nivel serologic pot apărea reacţii încrucişate între cele două specii.

Coloniile de *K. denitrificans* sunt mai mici, netede. Criteriul de diferenţiere este reprezentat de reacţia negativă pentru catalază şi reacţia pozitivă pentru reducerea nitraţilor.

Fig. 121. Profilul biochimic al speciei *B. catarrhalis* (C-control, G-glucoza, M-maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html)

Fig. 122. Profilul biochimic al speciei *Kingella denitrificans* (C-control, G-glucoza, M- maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

Bibliografie selectivă

Ison C., Robertson B. 1999. *Neisseria. Infection and Immunity*. EI, Acad. Press, Ed. P. Delves, I. Roitt.

Nowicki S, Selvarangan R, Anderson G. 1999. Experimental transmission of *Neisseria gonorrhoeae* from pregnant rat to fetus.Infect Immun. 67(9):4974–6.

www.student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab16/dkngon.htm

Muriel C. Schneider, Rachel M. Exley, Hannah Chan, Ian Feavers, Yu-Hoi Kang, Robert B. Sim and Christoph M. Tang. 2006. Functional Significance of Factor H Binding to *Neisseria meningitidis*. The Journal of Immunology. 176: 7566–7575.

www. textbookofbacteriology.net/.../N.gonorrhoeae.jpg

www.visualphotos.com/image/2x4140933/meningitis_bacteria_neisseria_meningitidis

www.cdc.gov/meningitis/about/photos.html

Unemo, M., Olcen, P., Jonasson, J., Fredlund, H. 2004. Molecular Typing of Neisseria gonorrhoeae Isolates by Pyrosequencing of Highly Polymorphic Segments of the porB Gene. J. Clin. Microbiol. 42: 2926–2934.

Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition http:// www.accessmedicine.com

Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7. BACILI GRAM NEGATIVI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ

7.1. Familia Enterobacteriaceae

Din această familie fac parte bacterii Gram negative, larg răspândite în natură (în sol, în ape, pe plante, în tractul intestinal al omului şi al animalelor). Morfologia tipică pe mediul solidificat este cea de bacili mobili cu flageli peritrihi sau imobili, dar în probele clinice este mult mai variată. Unele specii sunt capsulate (*Klebsiella* sp.), dar majoritatea sunt necapsulate. Familia include aproximativ 30 de genuri şi 110 specii, majoritatea comensale, dar şi specii patogene (produc diaree, gastroenterite, enterite, dizenterie, adenite mezenterice, febra septicemică).

Speciile sunt grupate în triburi, dintre care 20–25 specii sunt importante din punct de vedere clinic:

- *E. coli* produce infecţii ale tractului intestinal, urinar, meningita neonatală;
- *Sh. dysenteriae,* agentul dizenteriei bacilare;
- *S. enteritidis* produce toxiinfecţii alimentare, gastroenterite;
- *S. typhi* produce febra tifoidă;
- *Proteus sp.,* saprobiont pe materia organică în descompunere;
- *Yersinia pestis*, agentul ciumei bubonice;
- *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp.;
- *Erwinia,* o bacterie fitopatogenă etc.

Sunt bacili Gram negativi nesporulaţi (pe frotiu, diferitele enterobacterii nu se disting morfologic), fără exigenţe nutritive, aerobi, facultativ anaerobi, fermentează numeroase glucide, adeseori cu formare de gaze, sunt pozitive pentru catalază (cu excepţia *Sh. dysenteriae*, serotip 1), oxidază-negative, reduc NO_3 la NO_2. Fermentează glucoza, cu sau fără producere de gaz, proprietate metabolică importantă pentru diferenţierea de alte bacterii (bacili Gram negativi glucozo-fermentativi).

Unele specii sunt componente ale microbiotei normale a omului şi animalelor şi rareori produc manifestări clinice, altele sunt totdeauna patogene (*Salmonella sp., Shigella sp.*).

Enterobacteriaceele au o structură antigenică complexă (fig. 123) şi produc o mare varietate de toxine. La *E. coli* s-au identificat peste 150 de variante ale antigenului O termostabil (LPS), peste 100 de variante ale antigenului termolabil K (polizaharid capsular) şi peste 50 de variante ale antigenului H (flagelar).

Antigenul O, reprezentat de polizaharidul regiunii externe a LPS, este alcătuit din secvenţe glucidice repetitive, este termo- şi alcoolo-rezistent şi se evidenţiază prin reacţia de aglutinare. Antigenul O se păstrează sub forma suspensiei celulare alcoolate.

Fiecare gen de enterobacterii are un antigen O cu specificitate de grup, dar un singur organism poate avea câteva antigene O. Uneori genuri diferite de enterobacterii (*Shigella sp.* şi *E. coli*) au antigene O comune. Serul imun anti-O de *E. coli* reacţionează încrucişat şi aglutinează celulele de *Providencia sp., Klebsiella sp., Salmonella sp.*.

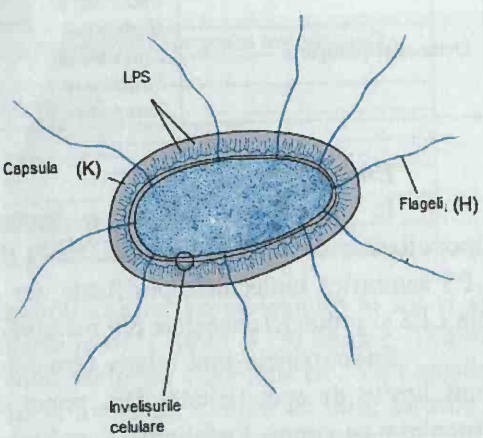


Fig. 123. Structurile antigenice parietale prezente la enterobacterii (după Brooks şi colab., 2007).

Antigenul K este localizat la suprafaţa celulei, extern în raport cu antigenul O. La unele genuri (*Klebsiella sp., Escherichia sp.*), antigenul K este de natură *polizaharidică*, iar la altele este de natură *proteică*. Prezenţa antigenului K maschează antigenul O şi inhibă aglutinarea bacteriană cu anticorpi specifici anti-O.

Antigenul H este reprezentat de proteina flagelară, denaturată de căldură şi de alcool. Se conservă sub forma suspensiei celulare în formol. Determinanţii antigenici H sunt reprezentaţi de secvenţe de aminoacizi ai flagelinei, proteina structurală a flagelilor.

Dintre numeroşii agenţi patogeni care produc infecţii diareice (cauzele principale ale morbidităţii şi mortalităţii în special în ţările subdezvoltate), reprezentanţii familiei *Enterobacteriaceae* au cea mai mare frecvenţă.

În funcţie de gradul de patogenitate a tulpinilor de enterobacterii faţă de organismul gazdă se disting (tabelul 15):

- specii înalt patogene;
- specii patogene;
- specii condiţionat patogene, adică nepatogene în condiţii obişnuite, dar care pot deveni patogene dobândind determinanţi genetici de virulenţă, sau în anumite condiţii, când organismul gazdă are o capacitate de apărare scăzută. De aceea, aceste bacterii sunt considerate condiţionat patogene sau oportuniste.

Tabelul 15.

Categorii de patogenitate ale membrilor familiei *Enterobacteriaceae* (după Bernie şi colab., 1999, modificat).

Categoria de patogenitate	Gruparea taxonomică	Semnificaţia etiologică
Înalt patogene	*S. typhi* *Sh. disenteriae* *Y. pestis*	Certă
Patogene	*Salmonella* sp. *Shigella* sp. *Yersinia* sp.	Certă
Condiţionat patogene	*Citrobacter* sp. *Enterobacter* sp. *E. coli* (alte localizări decât cea intestinală sau urinară) *Klebsiella* sp. *Proteus* sp. *Morganella* sp. *Providencia* sp. *Serratia* sp.	Semnificativă în prelevatele necontaminate (LCR, numai din cavităţi închise).
Ocazional patogene	*Cedeceea* sp. *Hafnia* sp. *Kluyvera* sp. *Pantoea* sp. *Tatumella* sp.	

Endotoxine

În membrana externă a bacteriilor Gram negative se găseşte complexul molecular lipopolizaharidic (LPS). Termenii de "LPS" şi "endotoxină" sunt folosiţi cu sensuri echivalente, dar LPS semnifică moleculele purificate, iar denumirea de "endotoxină" desemnează complexul format din LPS şi proteinele asociate din membrana externă.

Endotoxinele sunt relativ termo-stabile şi mai puţin toxice decât exotoxinele, iar efectele lor sunt lipsite de specificitate. Din punct de vedere chimic, endotoxinele LPS sunt macromolecule complexe ce conţin fosfolipide şi polizaharide. Toxicitatea lor rezidă în fracţia fosfolipidică. Nu se denaturează şi nu rezultă anatoxine.

Endotoxinele LPS reprezintă 25% din moleculele de suprafaţă ale celulei şi sunt esenţiale pentru integritatea membranei externe.

7.1.1. Genul *Escherichia*

Genul *Escherichia* cuprinde microorganisme comensale, componente obişnuite ale microbiotei normale intestinale la om şi animale. În intestinul uman au un rol important în sinteza vitaminelor din grupul B. În anumite condiţii, bacteriile g. *Escherichia* manifestă potenţial de patogenitate. Sunt bacili Gram negativi, mobili sau imobili, care folosesc *acetatul* ca unică sursă de carbon, dar nu folosesc citratul. Unele tulpini sunt anaerobe. Majoritatea tulpinilor fermentează lactoza (fig. 124).

Fig. 124. Aspectul culturii de *E. coli* pe mediu lactozat (colonii lactozo-pozitive).

Conţinutul în G+C al ADN variază între 50–51 moli %. *E. coli* are habitatul primar în intestinul organismelor cu sânge cald, împreună cu alte câteva sute de specii bacteriene.

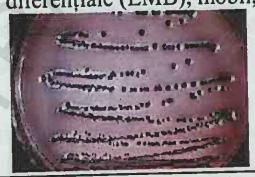
Caractere morfologice şi de cultură. Celulele au formă de bacili drepţi sau uşor curbaţi, cu dimensiuni cuprinse între 1-3 μm lungime. Pot fi mobili datorită flagelilor peritrichi sau imobili. Unele tulpini prezintă fimbrii. Pe baza reacţiei de hemaglutinare directă sau a diferenţelor morfologice, tulpinile de *E. coli* pot fi împărţite în mai multe tipuri fimbriale. *E. coli* se dezvoltă bine pe medii simple de cultură. Pe geloză pot dezvolta colonii „S" convexe, umede, cu suprafaţa lucioasă, margini netede, sau colonii „R" uscate, cu marginile crenelate.

Caractere biochimice şi de metabolism. Sunt microorganisme aerobe şi facultativ anaerobe. Se dezvoltă între limite largi de temperatură şi pH. Creşterea optimă se înregistrează la 37°C şi pH = 7,2 – 7,8.

Capacitatea de a fermenta lactoza permite diferenţierea *E. coli* de alte *Enterobacteriaceae (Salmonella sp., Shigella sp., Proteus* sp. etc.), dar există şi tulpini care fermentează tardiv sau deloc lactoza (tabelul 16). Unele tulpini de *E. coli* sunt capabile să elaboreze substanţe cu acţiune antagonistă (colicine).

Tabelul 16.

Diferenţierea enterobacteriilor în funcţie de capacitatea de a fermenta lactoza şi unele caractere de cultură (după Brooks şi colab., 2007).

Specii care fermentează rapid lactoza
Escherichia coli: luciu metalic pe medii diferenţiale (EMB), mobil, colonii cu profil plat, nevâscoase 
Enterobacter aerogenes: colonii cu profil înalt, fără luciu metalic, adesea mobil, creşterea mai vâscoasă
Klebsiella pneumoniae: imobil, colonii foarte vâscoase, mucoide.
Specii care fermentează tardiv lactoza
Edwardsiella sp., *Serratia* sp., *Citrobacter* sp., *Arizona* sp., *Providencia* sp. , *Erwinia* sp.
Specii care nu fermentează lactoza
Shigella sp.: imobil, nu produce gaz din fermentarea glucozei;
Salmonella sp.: mobil; acid şi adesea produce gaz din fermentarea glucozei;
Proteus sp.: "*swarming*" pe agar; hidrolizează rapid ureea, miros de amoniac.

Rezistenţa la agenţi chimici, fizici şi biologici. Enterobacteriile supravieţuiesc în sol şi apă, luni de zile. Majoritatea tulpinilor sunt omorâte prin expunerea la 60°C timp de 30 minute. Tulpinile de *E. coli* sunt sensibile la acţiunea antisepticelor uzuale: fenol, sublimat, cloramina etc. Sunt sensibile la acţiunea unor coloranţi, cum ar fi verdele brilliant, verdele malachit, clorura de litiu, sărurile de seleniu, teluritul de potasiu, tetrationatul etc., care au acţiune bacteriostatică asupra tulpinilor de *E. coli.* Tulpinile de *E.coli* sunt sensibile la acţiunea bacteriofagilor; iar unele tulpini sunt lizogene. Rezistenţa tulpinilor de *E.coli* faţă de antibiotice şi chimioterapice este în creştere, mediată în unele cazuri de plasmide R.

E. coli este cea mai abundentă în conținutul intestinului gros, reprezentând până 1% din totalul populației bacteriene. *E. coli* are capacitatea de a ocupa nișe ecologice cu condiții diferite: crește anaerob și aerob. Intestinul oferă predominant condiții anaerobe, dar habitatul în strânsă proximitate cu celulele epiteliale unde O_2 difuzează din capilarele sanguine, creează condiții aerobe. *E. coli*, inclusă în stratul de mucus ce acoperă epiteliul intestinal, crește cu un timp de generație de 40–80 min. Populația de celule *E. coli* din conținutul luminal al cecumului rozătoarelor este în faza staționară și este eliminată în materiile fecale.

Deși *E. coli* este un organism comensal al intestinului, diferit de tipurile virulente, produce frecvente infecții digestive, ale tractului urinar, ale plămânului și chiar ale sistemului nervos. Este un patogen oportunist și poate determina un proces infecțios, depinzând de densitatea populației bacteriene și de factori predispozanți: compromiterea funcției de apărare și creșterea permeabilității barierei intestinale. Astfel, septicemia cu *E. coli* la pacienții debilitați își are originea în tractul gastrointestinal și nu din contaminarea exogenă cu *E. coli*. Tulpinile comensale de *E. coli* supraviețuiesc și cresc în mediul extern. Este rezistentă la o varietate de factori fizici și chimici, la care se adaptează supraviețuind perioade lungi fără creștere. Solul, apa și alimentele sunt habitatele alternative extraintestinale ale *E. coli*.

Tulpinile patogene de *Escherichia coli*, care au dobândit seturi de gene de virulență, sunt capabile să producă diferiți factori de virulență (fimbrii, capsulă, toxine, siderofori) (fig. 125).

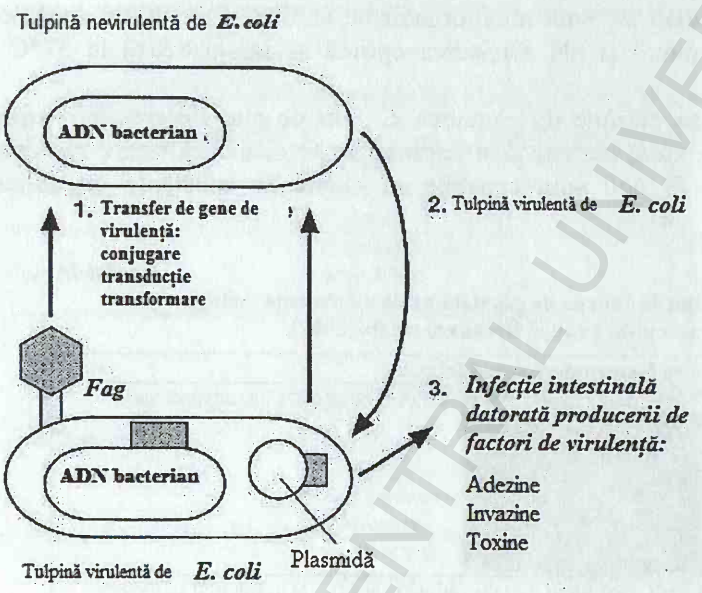


Fig. 125. Reprezentarea modului de selectare a tulpinilor virulente de *E. coli* după dobândirea genelor de virulență prin transfer orizontal http://129.109.115.69/microbook/images/fig7_2.jpg (după Iglewski și Clark, 1990).

Există unele tulpini de *E. coli* defective, nepatogene, altele care prezintă toți factorii de patogenitate caracteristici speciei, precum și unele dotate cu doar unii dintre aceștia în asociații foarte diferite. Astfel de tulpini, în cazul contaminării intestinului cu număr foarte mare de bacterii, pot genera:

- enterite grave, mai ales la sugar, la copil și la adultul vulnerabil;
- infecții extraintestinale, când contaminează zone ale organismului sterile în mod natural (ITU, infecții pulmonare, meningite, infectarea plăgilor, septicemii-bacteriemii).

ITU. E. coli determină peste 90% din totalul *infecțiilor tractului urinar* (ITU) (uretrocistite, cistite, nefrite și pielonefrite) însoțite de procente mari de bacteriemie. Colonizarea tractului urinar este inițiată de *invazia mucoasei* destinsă prin stază, urmată de progresia ascendentă a infecției, spre rinichi, împotriva fluxului urinar descendent. În rinichi, infecția se localizează cu predilecție în zona medulară. Tulpinile nefropatogene de *E. coli* produc hemolizină. Pielonefrita (infecția epiteliului tubilor renali) este produsă de tulpinile cu pili P, care se leagă de moleculele P de grup sanguin de pe membrana celulelor epiteliale ale tubilor renali.

80% dintre tulpinile de *E. coli* care produc meningite și septicemii (la nou-născuți) posedă Ag K1, asemănător polizaharidul meningococului de tip B.

Colibacilii dau, mai rar, peritonite, infecții ale vezicii biliare, ale plăgilor și arsurilor, bronhopneumonii, meningite neonatale. Tulpinile patogene de *E. coli* posedă diferite adezine care se deosebesc prin capacitatea de hemaglutinare, morfologie, antigenitate și specificitate de receptor.

Diareea adultului și *enterita gravă a sugarului* sunt tulburări inițiate de pătrunderea, autoselecția și proliferarea tulpinilor enteropatogene (EPEC, ETEC) în intestinul subțire (jejun și/sau ileon), urmată de invadarea mucoasei. Se estimează că în lume se produc în fiecare an un miliard de episoade diareice, dintre care 3,3 milioane sunt fatale, ceea ce plasează tulburările diareice pe locul doi în topul bolilor infecțioase letale. *E. coli* are proprietăți speciale care-i permit să treacă din mediul colonului, în alte nișe lipsite de competiția cu alte specii bacteriene. Colibacilii sunt agenții etiologici ai peritonitei, infecțiilor vezicii biliare, ale plăgilor și arsurilor, bronhopneumoniei sau meningitei neonatale.

La persoanele cu disfuncții imunitare, septicemia poate fi secundară ITU și se datorează trecerii *E. coli* în sânge.

Meningita la copii este produsă cu cea mai mare frecvență de *E. coli* și streptococii de grup B.

Caractere de patogenitate și virulență

Patogenitatea tulpinilor de *E.coli* este datorată unor factori de virulență asociați peretelui celular (factori de aderență și colonizare antigenică, antigene capsulare, antigenul somatic O) sau solubili (hemolizine, enterotoxine, siderofori) (tabelul 17).

Tabelul 17.

Factorii de virulență și formele clinice produse de diferite patovarietăți de *E. coli* (după Croxen and Finlay, 2009).

E. coli	Boala	Factori de virulență
ETEC	Diaree *cholera-like*	LT, ST, (CFA/I, CFA/II, CFA/III)
EIEC	Diaree apoasă, dizenterie	Ipas, sisteme de secreție de tip III (Mxi și Spa), VirG/IcsA
EPEC	Diaree apoasă	Esp, sisteme de secreție de tip III (Sep și Esc), intimină, Tir și BFP
EHEC	Colită hemoragică, sindrom hemoragic uremic	Factori EPEC, toxină *Shiga like*, hemolizină
EAEC	Diaree apoasă, mucoasă	AAF, EAST-1, Pet, Pic, hemolizină fimbrii F1845 și AIDA-I
DAEC	Diaree persistentă	Pili de tip I, pili de tip P, adezine afimbriale (Afa), hemolizine, CNF-1
UPEC	ITU	Capsulă, pili de tip I, adezine S-fimbriale, invazine IbeA și IbeB
SEC	Sepsis, meningită	

Tulpinile patogene de *E. coli* posedă diferite adezine care se deosebesc prin capacitatea de hemaglutinare, morfologie, antigenitate și specificitate de receptori.

După natura lor chimică, antigenele K se împart în două categorii:

- antigene K de natură polizaharidică (K1);
- antigene K de natură proteică (K_{88}, K_{99});

Antigenele K_{88} produc aglutinarea hematiilor de cobai, iar antigenele K_{99}, a celor de cal. Antigenele K_{88} și K_{99} mediază aderența *in vitro* și *in vivo* a bacteriilor la celulele epiteliale ale intestinului subtire (Burows, 1976). Ambele antigene sunt codificate de plasmide.

Antigenele K polizaharidice sunt trei factori antigenici diferiți (antigenele L, A și B). În general, o tulpină de *E. coli* produce un singur antigen K.

Specificitatea antigenului O este dată de secvența glucidică a catenei polizaharidice din molecula LPS. S-au identificat peste 170 serogrupe ale Ag O de *E. coli*.

Antigenul H, cu peste 50 de variante serologice, identifică serotipul *E. coli*. Serotipurile de *E. coli* sunt combinații specifice de antigene O și H.

Antigenul K identifică tulpinile de *E. coli* prin specificitatea antigenică a capsulei. De exemplu, *E. coli* K1 este cea mai comună cauză a faringitei bacteriene la copii.

Cele mai multe tulpini bacteriene produc proteine termolabile de suprafață, cu structură filamentoasă, vizibile la microscopul electronic: fimbrii diferite din punct de vedere antigenic de Ag O, H sau K.

Toxigeneza. O toxină comună bacteriilor patogene Gram negative, este *antigenul somatic O*, de natură glico-lipo-polipeptidică, termostabil. Rezistă la acțiunea alcoolului, formolului și acidului clorhidric.

Hemolizinele, codificate de plasmida Hly, produc liza hematiilor de la diferite specii de animale. *E. coli* produce 2 tipuri de hemolizine:

- α, filtrabilă, antigenică;
- β, legată de corpul bacterian, nefiltrabilă, neantigenică.

E. coli produce două *enterotoxine:*

- *enterotoxina termolabilă** (LT), cu greutate moleculară de 86,5 kDa. Are proprietăți antigenice și este asemănătoare cu toxina holerică din punct de vedere al structurii, funcției și mecanismului de acțiune (Levine, 1983);
- *enterotoxina termostabilă* (ST), cu greutate moleculară de 1,5–5 kDa, lipsită de proprietăți antigenice (Sack, 1980).

* Enterotoxina TL are proprietăți de adjuvant, stimulator al imunității mucoaselor, dar nu este secretată de celula bacteriană. De aceea, trebuie extrasă din celule, clivată enzimatic și redusă înainte de a-și produce efectul toxic. Enterotoxina TL se leagă de gangliozidul Gm1, ceea ce întârzie și îi reduce efectul enterotoxic. Ca adjuvant, enterotoxina TL poate fi administrată fără să fie asociată cu un purtător, simultan cu antigenul oral (Johnson, 1994).

În funcție de mecanismele de patogenitate, epidemiologie, serotip, de manifestările clinice, de modul de aderență, de capacitatea de a invada epiteliul intestinal, tulpinile de *E. coli* care determină tulburări diareice sunt împărțite în șase *virotipuri sau patotipuri sau patovarietăți*: EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, EAEC, DAEC, iar cele extraintestinale (ExPEC de la *extraintestinal enteropathogenic E. coli*) în două virotipuri: UPEC și SEC. Virotipia corelează mai direct diferitele tulpini de *E. coli* cu procesul patologic, decât cu serotipia.

1) *Tulpinile enteropatogene* (*enteropathogenic E. coli* EPEC): serogrupurile O (O26, O55 etc.) posedă o plasmidă de aproximativ 60 kDa, denumită EAF (*entero-adherence factor*), care determină capacitatea acestor tulpini de a produce un tip de aderență localizată la celulele liniei HEp-2. Tulpinile EPEC produc diareea infantilă severă la copii mai mici de 1 an, la viței, purcei, miei. Aderența este urmată de atașarea intimă a bacteriilor la suprafața celulelor gazdă, mediată de o proteină a membranei externe – *intimina*, considerată factor de virulență a tulpinilor EPEC.

Tulpinile EPEC formează una dintre cele câteva grupe de tulpini diareice de *E. coli*, care produc cazuri sporadice de diaree și se deosebesc de alte tulpini de *E. coli*, prin capacitatea de a produce leziuni caracteristice în enterocitele intestinului subțire, cu modificări ale citoscheletului și pierderea microvililor ce formează bordura în perie. Patogeneza cu EPEC parcurge 3 stadii:

- EPEC se atașează de celulele mucoasei intestinului subțire, într-o asociație labilă, prin intermediul fimbriilor. Genele pentru aderență sunt plasmidiale;
- celulele epiteliale activează tirozin-kinazele și nivelul Ca^{2+} intracelular crește;
- după aderența inițială la epiteliu, tulpinile EPEC se atașează strâns de membrana celulei epiteliale, ducând la dezorganizarea microvililor la zona de contact. Astfel de modificări histopatologice sunt cunoscute sub denumirea de *a*tașare (*a*ttaching) și dezorganizarea (*e*ffacement) microvililor (A/E). La zona de contact a bacteriilor cu suprafața celulei epiteliale, prin reorganizarea actinei, se formează structuri pseudopodiale în formă de cupă, ce constituie "piedestale" ce se alungesc progresiv, iar bacteria rămâne atașată la partea superioară. Suprafața piedestalului păstrează conformația curbă a bacteriei, iar distanța dintre celula bacteriană și membrana citoplasmatică este mai mică de 10 nm. La nivelul structurii piedestal se găsesc proteine ale citoscheletului (actină, actinină, catena ușoară a miozinei etc.), iar microfilamentele sunt dens împachetate.

Atașarea strânsă a celulei bacteriene și modificările structurale locale materializate în formarea piedestalului necesită o proteină bacteriană denumită *intimină* și sistemul de secreție de tip III. Intimina se leagă specific de o proteină a membranei celulei epiteliale. Proteina, a cărei origine pare a fi bacteriană, denumită *Tir* (*r*eceptorul *t*ranslocat al *i*ntiminei), este translocată și inserată în membrana celulei epiteliale prin mecanismul de secreție de tip III (fig. 126, 127).

Alte 2 proteine secretate, *Esp A* și *Esp B*, de asemenea translocate în citosolul celulei eucariote, sunt necesare pentru inserția membranară a *Tir*. Tulpinile EPEC sintetizează și transferă propriul lor receptor, pentru legarea strânsă de celula eucariotă.

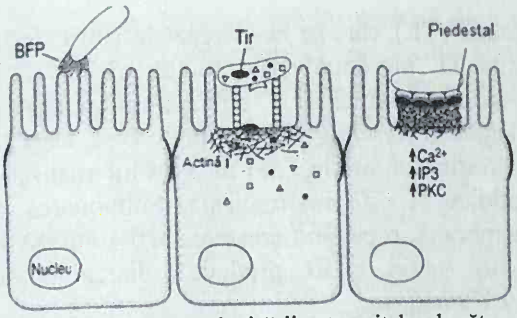


Fig. 126. Etapele colonizării enterocitelor de către EPEC (Lu şi Walker, 2008).

Fig. 127. Imagine de microscopie electronică de *scanning* a unei celule de EPEC aderată la un piedestal de actină (http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/Images/EPEC-pedestal-on-ntestinal.jpg).

Tulpinile EPEC secretă cel puţin 25 de polipeptide, care se găsesc în supernatantul culturii tisulare.

EPEC nu produce toxine, iar diareea este probabil consecinţa lezării celulelor intestinale, care nu mai absorb eficient apa.

Tulpinile EPEC se caracterizează prin modul aglomerat al aderenţei de celulele epiteliale (fig. 128), care determină formarea microcoloniilor pe suprafaţa celulei, şi prin incapacitatea de a produce toxina *Shiga*.

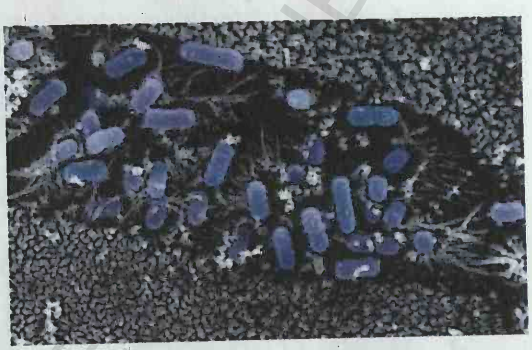


Fig. 128. Imagine de microscopie electronică de *scanning* a unei microcolonii de celule de EPEC (albastru) aderate la lumenul intestinal cu pierderea microvililor (gri) în zonele cu bacterii aderate (http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/Images/efacement.jpg).

2) *Tulpinile enterotoxigene* (*ETEC*) *(enterotoxigenic E. coli)* sunt agenţii etiologici ai "diareei călătorilor" şi produc o tulburare diareică asemănătoare cu cea produsă de *V. cholerae*. Se transmit prin alimente şi apă contaminată. Produc câteva tipuri de fimbrii cu rol de factori de colonizare CFA I şi CFA II, deoarece au rolul de a adera la celulele mucoasei, permiţând ETEC să colonizeze intestinul subţire. CFA I şi CFA II se găsesc numai la tulpinile diareagenice.

Sinteza adezinelor este codificată de plasmide.

După aderenţă şi colonizarea mucoasei intestinului subţire, tulpinile ETEC determină un sindrom diareic prin inhibarea resorbţiei ionilor de sodiu şi a apei, datorită producerii şi eliminării unor exotoxine, cu tropism pentru celulele intestinale (fig. 129).

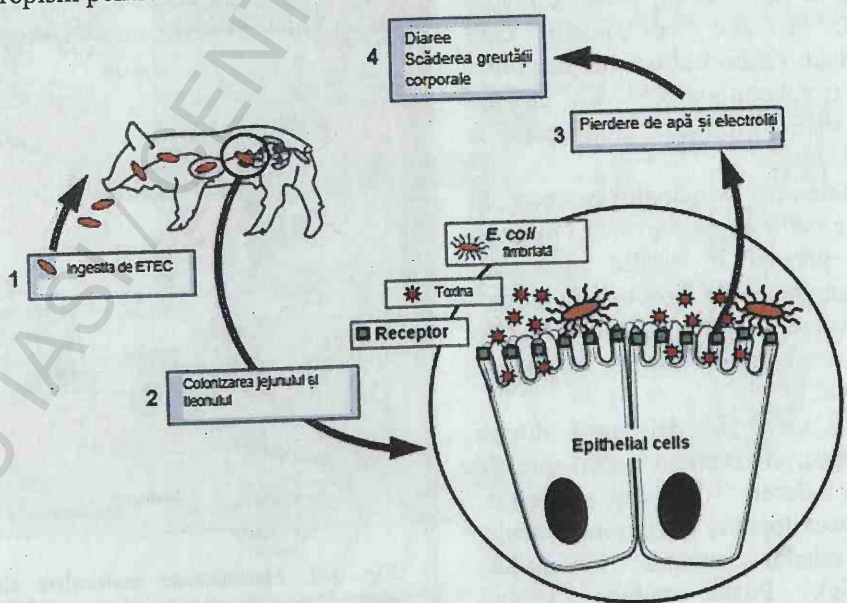


Fig. 129. Etapele infecţiei cu ETEC (adaptat după http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp).

Tulpinile ETEC eliberează o *enterotoxină termolabilă* (TL), care se inactivează la 100°C în 30 de minute, şi o *enterotoxină termostabilă* (TS). Enterotoxina TL are două variante antigenice (1 şi 2). LT 1 are un grad înalt de identitate cu secvenţa de aminoacizi a toxinei de *V. cholerae* şi are acelaşi plan structural: o subunitate A (activă) şi 5 subunităţi de legare B (*binding*). Subunităţile B se leagă de un gangliozid specific (GM1) al celulelor epiteliale ale intestinului subţire, dar nu sunt internalizate. Subunitatea A se activează prin clivajul legăturii peptidice şi este internalizată. Subunitatea A catalizează ADP-ribozilarea adenilat ciclazei legată de membrană, rezultând creşterea activităţii AMP ciclic şi creşterea secreţiei de fluide şi electroliţi (fig. 130). Astfel, ETEC produce o diaree apoasă neinflamatorie, asemănătoare cu cea produsă de infecţia cu *V. cholerae*.

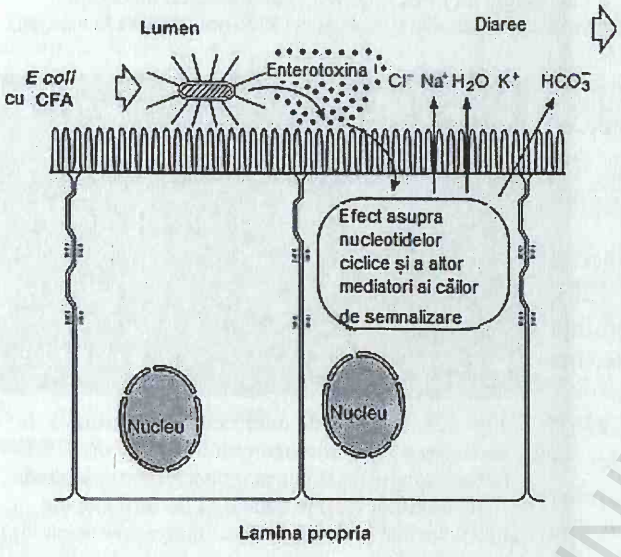


Fig. 130. Mecanismul producerii diareei apoase de către tulpinile de ETEC (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/pathogenesis).

Toxinele TS sunt peptide mici (18–50 aminoacizi). Toxina TS-1 se leagă de un receptor glicoproteic, activând o guanilat-ciclază legată de membrană. Creşterea GMP ciclazei creşte secreţia fluidelor şi electroliţilor, rezultând o diaree apoasă asemănătoare celei produse de toxina TL.

3) *Tulpinile EHEC* (*enterohaemorrhagic E. coli*) (serogrupul O157:H7) secretă cito-toxine puternice, denumite toxine *Shiga-like* (SLT I , SLT II) sau verotoxina (VT), deoarece sunt asemănătoare din punct de vedere anti-genic şi funcţional cu toxina Shiga clasică secretată de *S. dysenteriae*. SLT I este identică cu toxina Shiga, iar SLT II are omologie de 56%.

Structural, SLT este formată din 2 componente (A, B): o subunitate A şi 5 subunităţi B identice. Subunitatea B se leagă de un glicolipid membranar, iar subunitatea A este internalizată şi produce moartea celului prin inhibiţia sintezei proteinelor, împiedicând legarea aminoacil-ARNt de codonul ARNm.

SLT produsă de EHEC produce tromboza capilară şi inflamaţia mucoasei colonului, consecinţa fiind *colita hemoragică*.

E. coli O157:H7 este serotipul asociat cu colita hemoragică, produce diaree sanguinolentă şi alte complicaţii care periclitează viaţa: sindromul uremic hemolitic şi purpura trombocitopenică. La nivelul enterocitelor, EHEC produce leziuni specifice de tip A/E (131).

Bovinele sunt principalul rezervor de EHEC, cu rate înalte de portaj fecal. Agentul patogen este prezent în carnea proaspătă, deoarece contaminarea se produce în timpul sacrificării. Adeseori, infecţia omului este cauzată de consumul cărnii insuficient prelucrată termic.

E. coli O157:H7 determină diaree, colite hemoragice, sindrom hemolitic uremic (hipertensiune, dureri de cap, letargie, convulsii, encefalopatie, trombocitopenie, insuficienţă renală, anemie hemolitică, microangiopatie). Poate induce leziuni specifice la nivelul enterocitelor, de tip A/E.

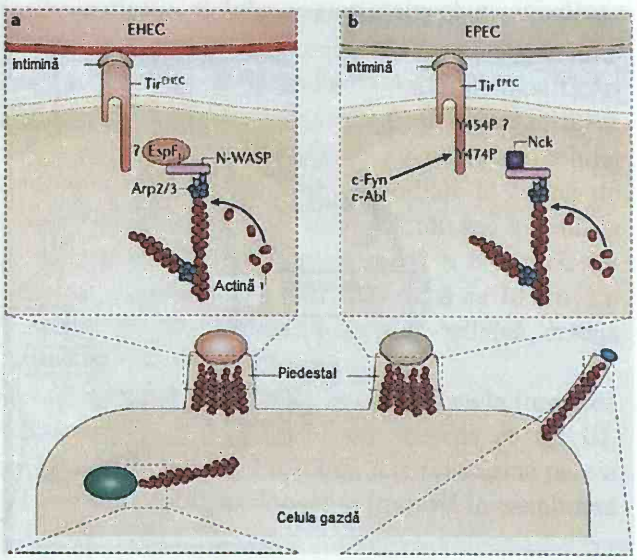


Fig. 131. Mecanismele moleculare ale formării piedestalurilor de actină în infecţia cu EHEC şi EPEC http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n5/images/nrmicro1391-f3.jpg.

Toxina termostabilă produsă de acest patovar (STEC) produce efect citopatic ireversibil pe linia Vero E6, fiind numită verotoxină, similară cu toxina produsă de *Shigella* şi neutralizată de serul anti-STX. Într-o primă etapă a procesului infecţios, tulpina aderă la mucoasa intestinală (rezistentă la pH acid) de manieră difuză sau produce, similar cu EPEC, leziuni A/E mediate de plasmida de 60 MDa, *eae* (de curând demonstrată în EHEC);

La tulpinile care infectează porcul, aderenţa este mediată de fimbrii, F 107; alte adezine sunt OMP, LPS. Receptorul pare a fi reprezentat de nucleolină, o proteină exprimată doar de celulele din criptele intestinale (fig. 132), care se divid şi au o durată de viaţă mai mare decât a celulelor care migrează spre lumen şi care vor fi distruse (Shin et al., 2000; Sinclair & O'Brien, 2002).

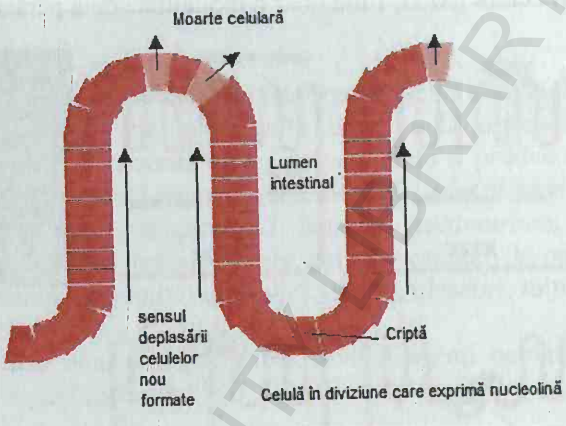


Fig. 132. Reprezentarea turn-over-ului celulelor lumenului intestinal (Sinclair et al., 2002).

Ulterior, toxina SXT se leagă de GM_3, care are densitate crescută în rinichi, mai ales în regiunea corticală unde se situează leziunile la pacienţii cu SHU (sindrom hemolitic uremic); după interacţiunea cu GM_3 endoteliul capilarelor renale este distrus, leziuni apărute fiind urmate de depunerea fibrinei şi a plachetelor în capilarele granulare, ocluzia capilarelor, reducerea fluxului sangvin în rinichi şi insuficienţă renală.

EHEC produce de asemenea leziuni trombotice în intestin, creier, pancreas. Se pare că leziunile induse de SXT sunt dependente de nivelul de TNF, IL-1 şi LPS. De asemenea, în sângele bolnavilor cu SHU s-au evidenţiat concentraţii ridicate de IL-8, activator şi chemoatractant al PMN (acesta din urmă indică inflamarea glomerului renal).

Alţi factori de virulenţă sunt *enterohemolizina*, care produce un fenotip non-hemolitic, codificată de plasmida de 60 MDa, pO157; *serin proteaze*, cu efect citotoxic asupra celulelor Vero E6, codificate plasmidial, care nu clivează IgA1, dar clivează pepsina şi factorul de coagulare V (conducând la exacerbarea simptomelor hemolitice), al căror rol lor în patogeneză este susţinut de prezenţa Ac specifici.

4) *Tulpinile enteroinvazive* (*enteroinvasive E. coli* EIEC) penetrează şi se multiplică în celulele epiteliale ale colonului, producând modificări ale mucoasei intestinale şi simptome asemănătoare cu cele determinate de *Shigella* sp., cu care sunt foarte asemănătoare genetic (nu se pot distinge prin hibridizarea ADN/ADN) (fig. 133). Virulenţa este dependentă de prezenţa unei plasmide de invazie şi constă în ulceraţii ale mucoasei digestive cu apariţia scaunelor muco-sanguinolente.

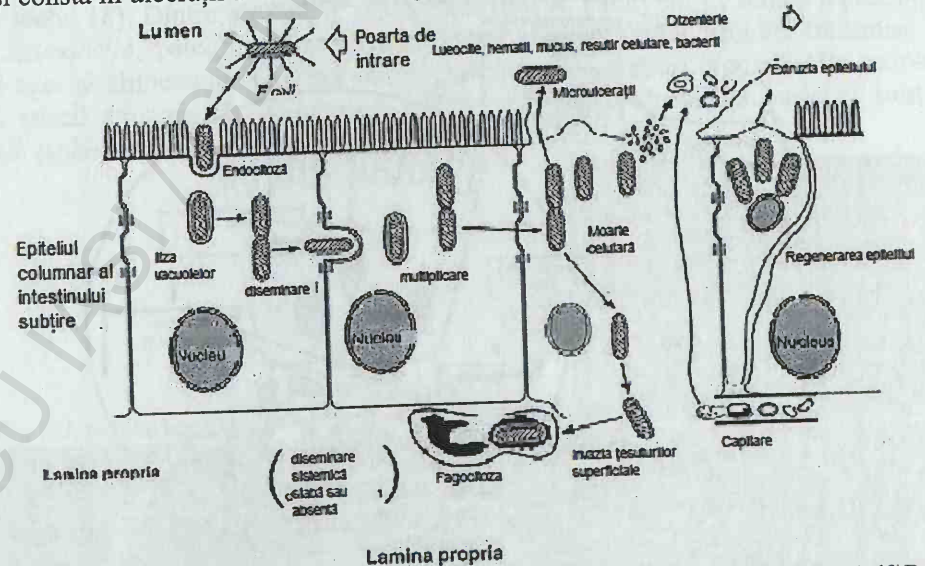
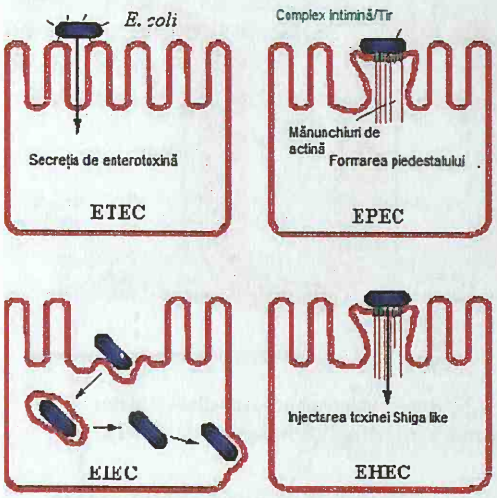


Fig. 133. Mecanismul patogenezei produse de tulpinile de EIEC (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/ Bpathogenesis).

Ca şi tulpinile de *Shigella sp.*, sunt invazive pe culturi celulare şi pozitive la testul Szereny (de producere a keratoconjunctivitei pe ochiul de cobai).

Invazia celulelor intestinale (ca şi pentru tulpinile EPEC, EIEC, EHEC) se face prin modificări ale microtubulilor citoscheletului şi, în general, nu este urmată de multiplicarea bacteriilor în celula gazdă, fiind doar o modalitate de a persista în organismul gazdă (fig. 134).



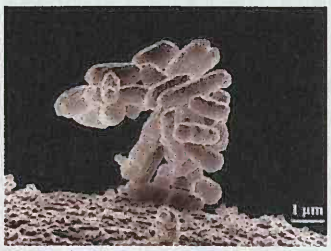


Fig. 135. Imagine de microscopie electronică de temperatură joasă (x 10000) a unui agregat de EaggEC aderat la mucoasa intestinală (http://emu.arsusd).

Fig. 134. Interacțiunea diferitelor patovaruri de *E. coli* cu celula gazdă intestinală (http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Bacteria%20Inv.htm).

5) *Tulpinile enteroaderente sau enteroagregative* (EAggEC), aparțin ultimului patovar descris, au proprietatea de a adera la culturile celulare în monostrat, având un fenotip agregativ (fig. 135). Tulpinile EAEC produc diaree datorită unei toxine ST-*like* (EAST) şi o exotoxină de 120 kDa, asemănătoare cu hemolizina produsă de tulpinile uropatogene.

6) *Tulpinile difuz-aderente* (DAEC) la suprafața celulelor eucariote în cultură, determină diaree la copiii mai mari de 18 luni. Este ultimul virotip de *E. coli* care a fost descris.

7) *Tulpinile* de UPEC (*uropathogenic E. coli*) produc infecții ale tractului urinar inferior care pot progresa pe cale ascendentă. Aceste tulpini prezintă adezine cu care aderă la celulele epiteliului tractului urinar, pentru a nu fi eliminate odată cu urina (prin adezine de tip I – manozo rezistente, de tip P la 80% din tulpinile implicate în pielonefrite, de tip S, AFA sau X); prezintă de asemenea rezistență la activitatea bactericidă a serului (hemolizine, siderofori).

8) SEC (*septic E. coli*) produce infecții generalizate complicate cu şoc septic şi meningită, factorii de virulență fiind pe de o parte reprezentați de structurile de aderență şi invazie, iar pe de altă parte de mecanismele de evitare a efectorilor imunitari (fig. 136).

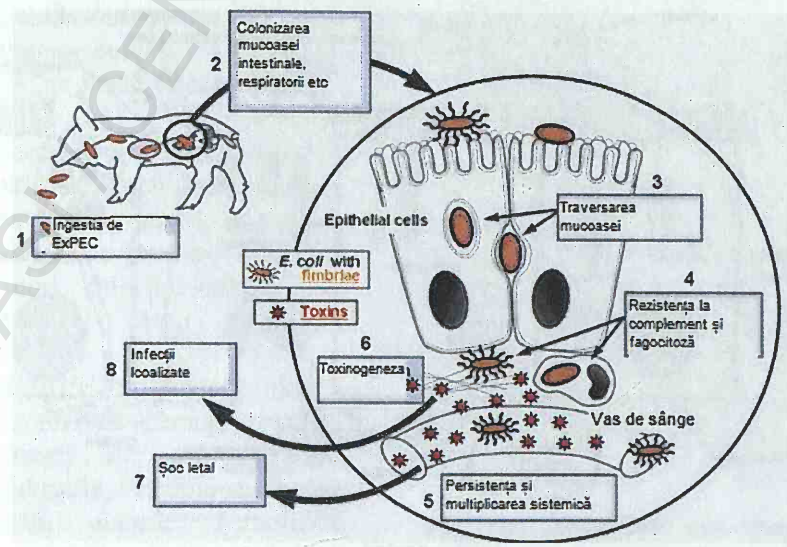


Fig. 136. Etapele infecției produse de patovarietățile extraintestinale (adaptat după http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp).

Epidemiologie. E. coli şi coliformii populează tractul digestiv în câteva zile după naştere şi constituie proporţia majoră a microbiotei aerobe, facultativ anaerobe. Prezenţa acestor enterobacterii în apă, lapte, este acceptată ca dovadă a contaminării cu fecale din apa de canal sau din alte surse. Unele tulpini pot deveni agenţi ai infecţiilor nosocomiale.

7.1.2. Genul *Salmonella* sp.

Salmonella este agentul etiologic al *salmonelozei*, una dintre cele mai frecvente boli transmise pe cale digestivă. Salmonelele sunt larg răspândite în natură, toate serotipurile cunoscute fiind parazite pentru om şi animale. Speciile de *Salmonella* infectează o varietate de gazde vertebrate şi produc un spectru relativ larg de maladii: gastroenterită, bacteriemie, febră enterică (enterocolită), infecţii focale, toate originare din infecţia enterică. Unele au spectru larg de gazdă (*S. enterica typhimurium, S. enteridis, S. choleraesuis*), iar altele sunt foarte restrictive (*S. enterica typhi*, aproape exclusiv la om), *S. pullorum* (la păsări), *S. dublin* (la bovine), *S. arizone* (la reptile) (Darwin, 1999). Adeseori, tulpini diferite de *Salmonella* produc entităţi clinice distincte la gazde diferite.

Salmonella, descrisă în 1880 de Eberth, este unul dintre cei mai studiaţi agenţi patogeni. Denumirea s-a dat după numele lui Daniel E. Salmon, cel care a izolat *S. enterica* serovar *choleraesuis* din intestinul de porc.

Genul *Salmonella* cuprinde bacili Gram negativi, mobili, patogeni. Clasificarea iniţială a fost făcută pe baa criteriilor epidemiologice, a spectrului de gazdă, a reacţiilor biochimice şi a structurii antigenice.

Metodele de diagnostic sunt bacteriologice şi serologice. *Salmonella* sp. se izolează, din sânge sau/din scaun, prin cultivare repetată pe medii diferenţiale. În cazul febrei enterice, scaunul este pozitiv, iar în cazul septicemiei, cultivarea sângelui este adeseori pozitivă. *Salmonella* sp. se izolează pe mediul MacConkey, EMB sau dezoxicolat, pe care se evidenţiază coloniile care nu fermentează lactoza (*Salmonella sp., Shigella sp., Proteus sp., Serratia sp., Pseudomonas sp.*). *Salmonella* sp. produce H_2S şi coloniile sunt negre datorită formării sulfitului de bismut.

Speciile genului *Salmonella* sp. necesită confirmare serologică, pentru a putea fi diferenţiate de unele tulpini cu profil biochimic similar de *Citrobacter sp., Hafnia sp., Proteus sp., E. coli* (produce H_2S), *Edwardisella tarda, Alteromonas putrefaciens* (fig. 137–139).

Variabilitatea antigenică la *Salmonella* este foarte mare, existând 170 serogrupuri. În laboratorul clinic s-au izolat peste 1400 serotipuri, în funcţie de diferenţele structurale ale *antigenului H* (flagelar), ţinta principală a acţiunii anticorpilor specifici, grupate la rândul lor, în funcţie de *specificitatea antigenului O în grupurile A, B, C_1, C_2, D şi E*. Unele sunt netipabile serologic.

Există serovarietăţi strict adaptate la gazda umană sau la o specie animală, în general auxotrofe (tabelul 18). Dintre acestea, *S. typhi*, paratyphi A, paratyphi C, sendai reprezintă serovaruri majore de *Salmonella*, patogene strict la om, agenţi ai sindromului tifoidic, transmise la om prin intermediul apei şi alimentelor contaminate de bolnavi sau purtători cronici. Alte serovarietăţi sunt adaptate la specii animale (*S. gallinarum,* abortus ovi/equi). Unele serovarietăţi sunt ubiquitare, prototrofe (*S. typhimurium, S. enteritidis*), dar pot produce TIAC.

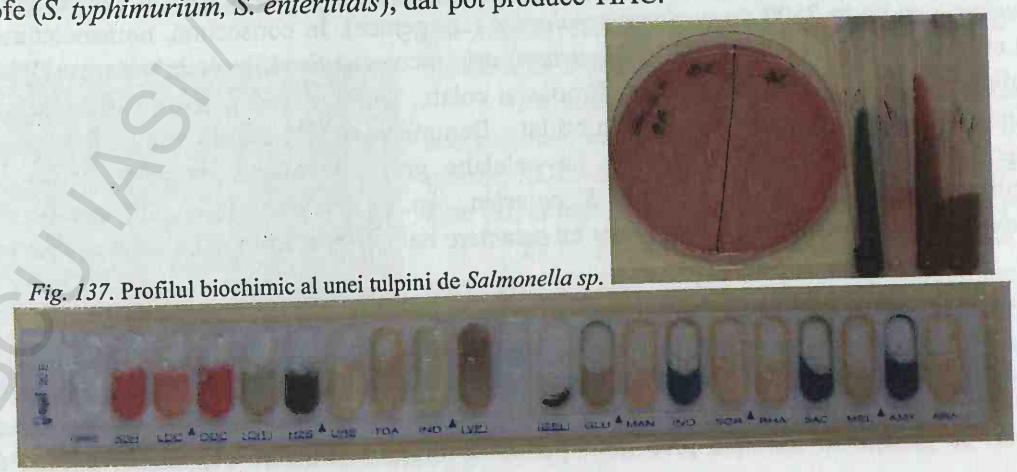


Fig. 137. Profilul biochimic al unei tulpini de *Salmonella sp.*

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

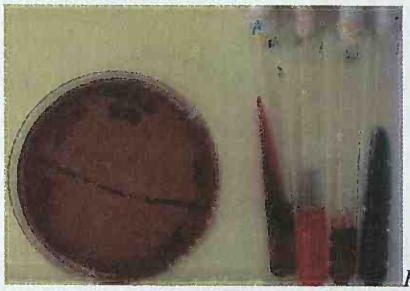


Fig. 138. Profilul biochimic al unei tulpini de *Proteus mirabilis.*

Fig. 139. Profilul biochimic al unei tulpini de *Enterobacter cloacae.*

Tabelul 18.

Formulele antigenice reprezentative ale serogrupurilor implicate în patologia umană (Brooks şi colab., 2007).

Grup O	Serotip	Formula antigenică (antigenul O, Vi, antigenul H-fazaI, fazaII)
D	*S.typhi*	**9, 12** (Vi):d: –
A	*S. paratyphi A*	**1, 2, 12**:a –
C_1	*S. choleraesuis*	**6, 7**:c:1,5
B	*S. typhimurium*	**1, 4, 5, 12**:i:1, 2
D	*S.enteritidis*	**1, 9, 12**:g, m: –

Mai puţin de 10 serotipuri din cele peste 2500 identificate prin teste biochimice şi serologice, produc majoritatea infecţiilor: *S. typhmurium, S. enteridis, S. heidelberg*, *S. newport, S. paratyphi A* (serogrup A), *S. paratyphi* B (serogrup B), *S. cholerae suis* (serogrup C), *S. typhi* (serogrup D), dar şi alte serotipuri produc febra enterică (febra tifoidă) la om şi reprezintă o problemă de sănătate publică. *S. typhimurium* produce infecţii asemănătoare la şoarece.

După ultima clasificare, bazată pe reacţiile de hibridare ADN-ADN, se admite că toate tulpinile de *Salmonella* formează un continuum, nu sunt specii diferite, ci aparţin unei singure specii- *S. enterica* – cu peste 2500 de *variante serologice* (antigenice). În consecinţă, nomenclatura folosită curent cu gen şi specie (*S. typhi, S. typhimurium*) este incorectă. Studiile de hibridare ADN-ADN au evidenţiat existenţa a *7 grupe evolutive* (Brooks şi colab., 2007). Aproape toate variantele antigenice infecţioase pentru om aparţin grupei I de hibridare. Denumirea de *S. enterica* ssp. (subspecia) *enterica* este acceptată pentru tulpinile grupei I, iar celelalte grupe de hibridare aparţin altor subspecii. Denumirea corectă propusă este cea de *S. enterica*, ssp. *enterica* serotip typhimurium (prescurtat *S. typhimurium*). Denumirea de gen se scrie cu caractere italice, iar serotipul, cu caractere romane).

Structura antigenică

Antigenul O prezintă caracteristicile structurale comune enterobacteriilor.

Antigenul de înveliş (K) (germ. *Kapsel* = capsulă), desemnat şi cu prescurtarea Vi, a fost descris de Pitt (1935) la *S. typhi*. Din punct de vedere chimic este glico-lipo-polipeptidic. De cele mai multe ori se găseşte în cantitate prea mică pentru a forma o structură capsulară vizibilă, dar este

suficient pentru a masca Ag O şi pentru a inhiba aglutinarea celulelor, în prezența serului specific anti-O. Fenomenul O-inaglutinabilității tulpinilor bogate în antigen Vi poate fi interpretat fizico-chimic, ca rezultat al competiției celor două antigene pentru suprafața celulei.

Liniile bacteriene care au antigen Vi, vor fi aglutinate numai de Ac anti-Vi sau anti-H.

Antigenul Vi se deosebeşte de Ag O prin conținutul mai ridicat în acizi graşi. Este rezistent la alcool, dar se inactivează prin fierbere timp de două ore, ceea ce permite "demascarea" antigenului O. Astfel, celulele devin aglutinabile în prezența anticorpilor specifici anti-O.

Antigenul Vi se găseşte la puține serotipuri de *Salmonella*, cărora le conferă rezistență la fagocitoză.

Infecția cu o tulpină de *Salmonella* care posedă toate cele trei tipuri de antigene, determină apariția în ser a anticorpilor specifici, anti-O, anti-H şi anti-Vi. Identificarea anticorpilor anti-Vi se poate face numai după îndepărtarea anticorpilor anti-O şi anti-H, prin absorbția serului cu o tulpină lipsită de Ag Vi.

Prin trecerea formelor coloniale S (*Smooth*) în forme coloniale R (*Rough*) au loc modificări chimice profunde ale antigenului O, între care şi înlocuirea totală sau parțială a complexului polizaharidic al formelor S, cu lipide caracteristice formelor R. Celulele tulpinilor care cresc sub forma coloniilor R tind să aglutineze spontan şi se numesc variante antigenice R. Aceste celule nu au antigenele O şi Vi, dar dacă sunt mobile, au antigene H.

Organismele pot pierde antigenul H şi devin *imobile* sau pierd antigenul O (prin sinteza incompletă a LPS, căreia îi lipseşte regiunea polizaharidică externă, asociată cu trecerea de la colonii de tip S, la colonii de tip R). Antigenul Vi este pierdut parțial sau complet. Antigenele sunt pierdute sau recâştigate prin evenimente de transducție.

Morfologie. Salmonelele sunt bacili Gram negativi, necapsulați, de 2–4 μm lungime şi 0,6 μm diametru, mobili, cu flageli dispuşi peritrich (fig. 140).

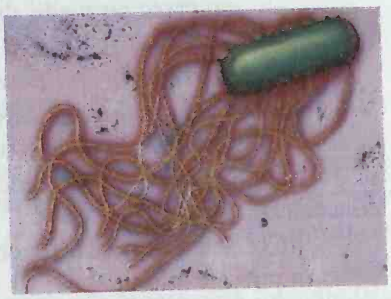


Fig. 140. Imagine de microscopie electronică, prin tehnica coloraţiei negative, a unei celule de *Salmonella* sp. cu flageli dispuşi peritrih (www.healthhype.com/tag/salmonella).

Pe medii nutritive simple, salmonelele se dezvoltă rapid, în 6 ore în mediu lichid şi 24 ore pe mediu solid, cu colonii de tip S sau R.

S. paratyphi A, S. abortus ovis, S. typhi suis, S. sendai cresc puțin pe medii nutritive simple, generând colonii mici, transparente. *S. typhi* poate de asemenea să dezvolte colonii mici sau pitice care revin la forma normală prin trecerea pe medii cu lichid de ascită 10% sau tiosulfat de sodiu 0,1%.

Pe geloză cu sânge, salmonelele se dezvoltă fără producere de hemoliză (fig. 141).

Pe medii selective, cu lactoza ca indicator, formează colonii lactozo-negative nefermentative tipice (fig. 142–145): necolorate, semitransparente, bombate, uneori cu zona centrală colorată în negru (pe mediu ADCL la 48 ore), determinând o uşoară alcalinizare a mediului.

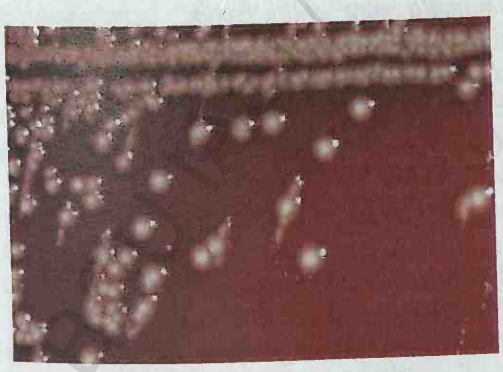


Fig. 141. Aspectul culturii de *Salmonella* pe geloză-sânge (Todar, 2009).

Pe medii selective ce conțin pe lângă lactoză şi alte zaharuri, aspectul coloniilor este diferit: roşu închis pe geloza XDL, albastru închis cu centru uneori negru pe agar HE şi roşu intens cu virajul mediului în roşu pe AVB.

Pe geloza Wilson-Blair coloniile sunt caracteristice după 48 ore de incubare: neregulate, opace, cu suprafața rugoasă şi margini neregulate, cu halou negru cu luciu metalic. Unele tulpini de *S. typhi* şi suspensiile dense din alte serotipuri determină colonii mici, verzui, cu marginile şi suprafața uşor rugoase, fără halou.

Fig. 142. Aspectul culturii de *Salmonella* pe mediul Hektoen (Todar, 2009).

Fig. 143. Aspectul culturii de *Salmonella* pe mediul AVB (http://microblog.me.uk/wp-content/uploads/salmonella_BGA.jpg).

Fig. 144. Aspectul culturii de *Salmonella* pe mediu XDL (Todar, 2009).

Fig. 145. Aspectul culturii de *Salmonella* pe mediul Wilson Blair (http://www.mikrobiyoloji.org/_0.jpg).

Caractere metabolice.

- cresc pe medii cu citrat ca unică sursă de carbon (Simmons);
- decarboxilează arginina şi ornitina;
- produc hidrogen sulfurat (cu unele excepţii);
- fermentează glucoza, manitolul, sorbitolul şi ramnoza cu producere de gaz şi pozitivarea reacţiei cu roşu de metil;
- nu produc fenilalanin-dezaminază, urează şi indol;
- nu degradează esculina;
- nu produc acetoina;
- nu dau reacţie pozitivă la testul Voges-Proskauer;
- produc lizin-decarboxilaza;
- nu cresc pe medii de cultură cu cianură de potasiu (excepţie: serotipurile din subgenurile IV şi V).

Rezistenţa la agenţi chimici, fizici şi biologici. Fiind organisme nesporulate, salmonelele sunt puţin rezistente la căldură. La 60°C culturile mor în 15–20 minute, iar la 100°C, în 5–7 minute. *S. senftenberg* (una dintre cele mai termorezistente salmonele cunoscute) rezistă 12 minute la 65,5°C şi 33 minute la 60°C. În alimente supravieţuirea este variabilă (între 10–180 zile), în funcţie de concentraţia de săruri şi pH.

Congelarea bruscă determină o reducere considerabilă a numărului de salmonele (până la 90%) în primele zile.

Salmonelele se dezvoltă bine la pH = 6 – 8,2. Valorile acide ale pH (sub 3,5) nu permit supravieţuirea mai mult de 6–12 ore. La pH > 9, dezvoltarea este inhibată.

Dezinfectantele de uz curent (sublimatul 1/1000, fenolul 5/1000, formolul 5/1000) omoară salmonelele în intervalul 30 minute – 2 ore. Concentraţiile saline mai mari de 8% nu permit creşterea salmonelelor. Sărurile biliare, deoxicolatul de sodiu, coloranţii din grupa trifenilmetanului (verde briliant, cristal violet, fucsina) au acţiune inhibitorie redusă. Antibioticele şi chimioterapicele au acţiune bacteriostatică sau bactericidă asupra salmonelelor. *S. typhi* este sensibilă la cloramfenicol, ampicilină. Celelalte serotipuri frecvent întâlnite la om sunt sensibile la tetraciclină, colimicină, ampicilină.

Patogeneză. Factorii majori de virulenţă la *Salmonella* sunt *endotoxinele, exotoxinele* şi *fimbriile.* Endotoxina conferă specificitatea serologică tulpinii. *Exotoxinele* termolabile sunt parţial asemănătoare cu cele de *E. coli.* Fimbriile mediază contactul şi aderenţa celulelor bacteriene cu celulele epiteliale. Se disting mai multe tipuri de fimbrii: fimbrii de tip 1 (Fim), fimbrii codificate de plasmide (PE), fimbrii polare lungi (LP) şi fimbrii subţiri spiralate (curli). Aceste tipuri distincte de fimbrii au tropism specific pentru un anumit tip celular sau pentru celule de la diferite specii de animale.

Salmonella traversează bariera epiteliului intestinal, în special la nivelul celulelor M, care acoperă plăcile Peyer (fig. 146). Celulele M au rolul de a pinocita antigenele solubile din lumenul intestinal, dar preiau şi antigene particulate (virusuri, bacterii, protozoare). Înglobarea bacteriilor nu este urmată de degradare lizosomală. Bacteriile intacte sunt transportate în vezicule care fuzionează cu membrana laterobazală şi sunt transferate celulelor subiacente (macrofage şi neutrofile), unele specializate în prelucrarea şi prezentarea antigenelor, fenomen denumit *transcitoză.* Antigenele sunt prelucrate în celulele dendritice şi în macrofagele subepiteliale şi sunt prezentate limfocitelor locale

sau sunt transferate celulelor interdigitate şi prezentate celulelor T interfoliculare. Celulele interdigitate care prezintă antigenul, derivă din celulele dendritice care au înglobat antigenul. Intrarea în celulele gazdă este condiţia majoră pentru supravieţuire. Neutrofilele au viaţă scurtă, dar au activitate antibacteriană constitutivă şi omoară bacteriile. Fagocitele mononucleare au activitate antibacteriană medie până la intensă, în funcţie de starea de activare. De aceea, ele pot fi efectoare, dar pot constitui şi o nişă de supravieţuire a agentului infecţios.

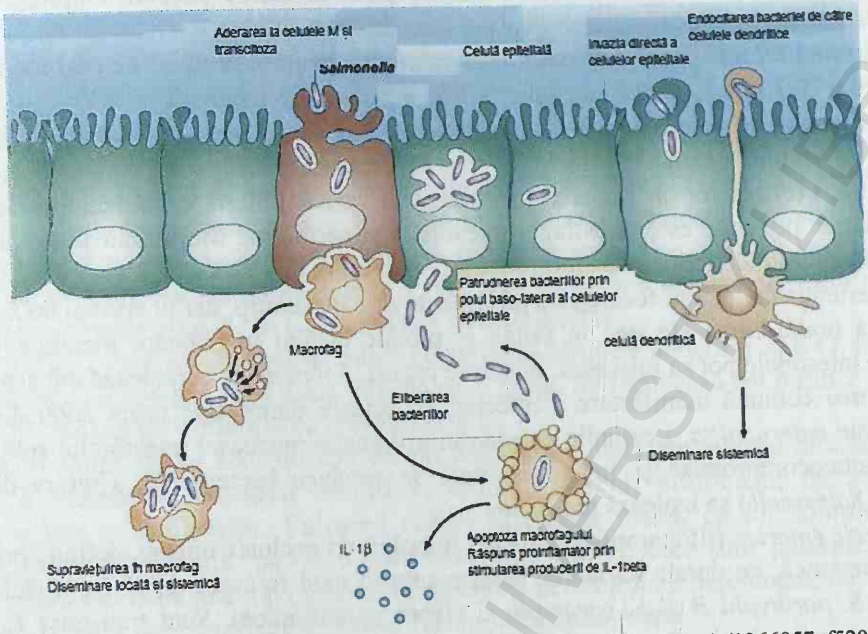


Fig. 146. Invadarea epiteliului intestinal de către *Salmonella* (s2.hubimg.com/u/1366057_f520.jpg).

Invazia fagocitelor neprofesioniste depinde de expresia receptorilor membranari de adezine, care pot fi împrumutaţi pentru invazie. Deoarece nu au activitate antibacteriană, fagocitele neprofesioniste au rolul de habitat. *Salmonella* se multiplică în ţesutul limfoid asociat mucoasei intestinale şi este eliminată în scaun.

În infecţiile experimentale sistemice la şoarece, *Salmonella* pătrunde în mucoasa intestinală şi aderă preferenţial la mucoasa intestinului subţire, unde invadează celulele M ale plăcilor Peyer. Bacteriile pot să distrugă celulele M invadate, precum şi enterocitele adiacente, dobândind accesul la structurile limfoide. Invazia celulelor M este un eveniment activ, deoarece bacteria induce formarea pliurilor membranei apicale a celulei şi astfel bacteria este înglobată.

În ţesutul limfoid subiacent celulelor M invadate, *Salmonella* este fagocitată de macrofagele rezidente. În contrast cu *Sh. flexneri*, *Salmonella* nu părăseşte vezicula de fagocitoză. Bacteria supravieţuieşte şi se multiplică în interiorul veziculei, datorită sistemului de secreţie de tip III ce interferă cu maturarea fagosomului şi cu eliberarea enzimelor hidrolitice, rezultând o vacuolă care adăposteşte *Salmonella*. Vacuola este transportată prin sistemul filamentelor de actină, în regiunea perinucleară. *Salmonella* lizează vacuola şi devine liberă în citoplasmă, protejată de un înveliş de actină.

Macrofagul este celula care vehiculează şi disemineză agentul infecţios pe calea ţesutului limfoid al gazdei. Bacteriile se acumulează şi se multiplică masiv în ficat, splină, măduva osoasă, toate bogate în celule fagocitare. Consecinţa este insuficienţa funcţională a organelor infectate, septicemia şi moartea la 4–6 zile după infecţie.

Capacitatea de a supravieţui şi de a se multiplica în fagocitele profesioniste este considerată ca fiind un factor esenţial de virulenţă a speciilor de *Salmonella* care produc infecţii sistemice. Factorii de virulenţă, transportorii de ioni, sistemele de secreţie celulară etc., sunt codificaţi de două aglomerări de gene: SPI-1 şi SPI-2 (*S*almonella *p*athogenicity *i*sland).

Celulele speciilor de *Salmonella* sunt singurele descrise care conţin 2 sisteme de secreţie de tip III (Hueck, 1998). Cele două sisteme de secreţie de tip III au, probabil, roluri diferite în patogeneză:

SPI-1 ar fi necesară pentru penetrarea mucoasei intestinale, iar SPI-2, pentru stadiile ulterioare, sistemice, ale infecției.

Patologie. S. typhi este înalt virulentă pentru om, dar nevirulentă pentru șoarece. *S. typhimurium* este virulentă pentru șoarece și puțin virulentă pentru om. Unele serotipuri sunt înalt patogene atât pentru om, cât și pentru animale. Salmoneloza este transmisă prin alimente. La gazdele sensibile, *S. enterica* produce enterocolită medie, până la diaree severă. Tulpinile care trec prin epiteliul intestinal pot produce bacteriemie, care duce la febră tifoidă.

Sindromul *febrei tifoide* este manifestarea clinică majoră, produsă de mai multe serotipuri de *Salmonella*, dar *S. typhi* este cea mai importantă. Perioada de incubație este de 10-14 zile. Infecția clinică este asociată cu febra, starea de rău general, durere de cap, bradicardie, mialgie. Splina și ficatul cresc în volum. Leziunile principale sunt hiperplazia și necroza țesutului limfoid din plăcile Peyer, hepatita, necroza focală a ficatului, inflamația vezicii biliare, a plămânului etc. Complicația majoră a infecției netratate este hemoragia intestinală și perforația. Mortalitatea este de 10–15%, dar tratamentul cu antibiotice reduce rata mortalității la mai puțin de 1%.

Bacteriemia cu leziuni focale este produsă de oricare serotip, dar în special de *S. cholerae suis*. După infecția orală, bacteriile trec în sânge și produc leziuni în plămân, meninge, oase etc., dar manifestările intestinale pot să lipsească. În aceste cazuri, *Salmonella* se izolează din sânge.

Cea mai comună manifestare a infecției cu oricare dintre cele peste 2000 de serotipuri de *Salmonella* este *enterocolita*. Leziunile constau în inflamația mucoasei intestinului subțire și gros. La persoanele imunocompromise și imunodeficitare se produce bacteriemia. Cultura din sânge este negativă, dar *Salmonella* se izolează din scaun.

Febrele enterice (tifoparatifoidice) sunt îmbolnăviri exclusiv umane, definite printr-o evoluție febrilă, caracteristică, cu durata variabilă, determinate în mod frecvent de *S. typhi* (febra tifoidă), *S. paratyphi A, S. paratyphi B și S. paratyphi* C (febre paratifoidice). Sunt transmise fie prin contact strâns cu o persoană colonizată sau, mai ales, prin ingestia alimentelor sau apei contaminate cu excreta de la persoanele colonizate.

Pentru inițierea unei infecții la om, prin consumul alimentelor contaminate, sunt necesare 10^5–10^6 celule bacteriene, în funcție de starea fiziologică a gazdei (Darwin și colab., 1999). Numărul relativ de celule este necesar pentru depășirea barierei acide a stomacului și pentru competiția cu microbiota normală a tractului intestinal. Infecția este favorizată de consumul băuturilor contaminate, deoarece traversează rapid compartimentul gastric. Alimentele care neutralizează aciditatea (brânzeturi, lapte) favorizează inițierea procesului infecțios. Indivizii umani cu hipoaciditate gastrică sunt mai sensibili la procesul infecțios. Se apreciază că în prezent se produc cel puțin 16 milioane de cazuri noi de febră tifoidă, cu 600000 morți/an.

Perioada de incubație este de 6–48 de ore, urmată de manifestările clinice: dureri de cap și abdominale, diaree (uneori sanguinolentă și bogat mucilaginoasă), vomă. Simptomatologia generală (alterarea stării generale, febră, stare de șoc) este determinată de cantitatea mare de *endotoxine* eliberate de salmonele. Evoluția prelungită a bolii și diseminarea largă sunt explicate prin capacitatea *S. typhi* de a supraviețui și chiar de a se *multiplica* în interiorul macrofagelor. Anticorpii serici care realizează titruri mari din a 3-a săptămână după infecție și unele antibiotice sunt ineficiente în această situație. Febrele enterice conferă o imunitate de lungă durată care persistă în majoritatea cazurilor, toată viața.

Manifestările encefalitice ale febrei enterice apar la circa 5% din totalul cazurilor.

Gastroenterita este forma comună de îmbolnăvire determinată de celelalte serotipuri, în afara celor menționate în etiologia febrelor enterice (*Salmonella net*ifoidă = NTS). Tulpinile NTS sunt prima sursă de gastroenterită și sunt larg răspândite: în tractul gastrointestinal al mamiferelor domestice și sălbatice, al păsărilor, reptilelor, insectelor. Infecția se produce prin ingestia unei cantități mari de microorganisme vii (peste 10^5 celule), de regulă prin intermediul unui aliment contaminat, preparat neadecvat (carne, ouă, produse lactate). În gastroenterite imunitatea este de scurtă durată, protecția fiind insuficientă față de cantitatea imensă de microorganisme ce reprezintă „doza infectantă". *Septicemia* poate să apară ca o complicație a unei toxiinfecții alimentare.

Simptomele clinice dispar într-o săptămână, dar *Salmonella* poate fi eliminată cu fecalele timp de circa 20 de săptămâni, la copiii de până la 5 ani şi circa 8 săptămâni de către adulţi. La copiii cu vârsta de până la un an şi la adulţii de peste 60 de ani, infecţia gastroenterică este mai gravă.

Metodele de *diagnostic sunt bacteriologice şi serologice*. *Salmonella* se izolează, din sânge sau/din scaun, prin cultivare repetată pe medii diferenţiale. În cazul febrei enterice, scaunul este pozitiv, iar în cazul septicemiei, cultivarea sângelui este adeseori pozitivă. *Salmonella* se izolează pe mediul MacConkey, EMB sau dezoxicolat, pe care se evidenţiază *coloniile care nu fermentează lactoza* (genurile *Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia, Pseudomonas*). *Salmonella* produce H_2S şi coloniile sunt negre datorită formării sulfitului de bismut.

Metodele *serologice* se folosesc pentru determinarea titrului de anticorpi la pacienţii cu maladie necunoscută.

Testul aglutinării pe lamă (serotipizarea) este o metodă rapidă şi sensibilă de identificare a culturii de *Salmonella*. O ansă de ser imun cu specificitate cunoscută şi o cantitate mică de celule din colonie sau din cultura bacteriană neidentificată, crescute pe mediu agarizat, se amestecă pe lama de microscop. Aglutinarea, dacă se produce, apare în câteva minute şi se observă la microscop, cu un obiectiv mic, la temperatura ambiantă sau la 37^0C. Serurile imune comerciale aglutinează specific antigenele O ale serogrupurilor A, B, C_1, C_2, D şi E de *Salmonella*.

Testul Widal (metoda diluţiei în tuburi) determină titrul de anticorpi anti-O şi anti-H. Titrul creşte în săptămânile a II-a şi a III-a după infecţia cu *S. typhi*. Se recoltează cel puţin 2 probe de ser la interval de 7–10 zile pentru evidenţierea creşterii titrului.

Iniţial în testul Widal s-au utilizat culturi bacteriene totale. Pe măsura cunoaşterii structurii antigenice şi a extinderii vaccinării anti-tifice, testul a devenit insuficient, datorită posibilităţii interpretării eronate a rezultatelor. Folosind culturi bacteriene totale, cu tot complexul antigenic, reacţia Widal pune în evidenţă, pe de o parte *anticorpi anti-H*, care sunt puternic stimulaţi prin vaccinare specifică sau după infecţie cu tulpini flagelate şi persistă timp îndelungat, iar pe de altă parte nu oferă nici un indiciu pentru infecţiile produse de variante neflagelate.

Din aceste motive, varianta iniţială a testului Widal a fost înlocuită cu analiza serică de ordin calitativ, în care se folosesc cele două variante antigenice: *O*, sub forma suspensiei celulare alcoolate şi *H*, ca suspensie celulară formolată.

Aglutinarea mediată de Ag H se citeşte după o incubare de 2 ore la 37°C (sau 52°C) şi 10 min. la temperatura camerei, iar cea mediată de Ag O se citeşte după o incubare de 20 de ore la 37°C şi 10 min. la temperatura camerei. Aglutininele anti-H şi anti-O apar în ser, la un titru scăzut, în prima săptămână după infecţie. Titrul lor creşte şi atinge valoarea maximă între 16 şi 29 zile de la infecţie şi rămâne ridicat în convalescenţă şi o perioadă scurtă după vindecare.

Aglutininele anti-H au titru înalt, de 1/1000–1/5000, iar aglutininele *anti-O* au titru de 1/250–1/1000. Seroreacţia calitativă poate fi considerată ca un indiciu al unei infecţii tifo-paratifoide, la titrul de cel puţin 1/500 pentru aglutininele anti-O şi la titrul de cel puţin 1/1000 pentru aglutininele anti-H.

În unele situaţii, reacţia de aglutinare bacteriană nu are sensibilitatea necesară. Alteori reacţia este fals negativă, deoarece antigenele celulei bacteriene nu sunt expuse la suprafaţă şi nu sunt accesibile reacţiei cu anticorpi. Antigenele capsulare maschează antigenul somatic O al peretelui bacterian. Se impune utilizarea unui preparat antigenic bacterian supus în prealabil tratamentului termic (prin fierbere), cu scopul de a expune antigenul O al suprafeţei celulare.

Utilitatea reacţiei este limitată datorită prezenţei anticorpilor ce dau reacţie încrucişată cu antigenele de *Salmonella*, iar interpretarea rezultatelor testului impune prudenţă.

Epidemiologie. Salmonella infectează în condiţii naturale numeroase specii de animale (cornute, păsări, rozătoare), care poartă agentul infecţios în lumenul intestinal, în ţesuturi (în special în organe) şi îl elimină în materiile fecale, lapte sau ouă.

Infecţia se transmite indirect prin alimentele şi apa contaminate, sau direct de la omul bolnav sau infectat, la cel sănătos sau de la animale la om. Marea majoritate a salmonelelor sunt infecţioase pentru animale. Acestea constituie rezervorul pentru infecţiile umane. Cele mai comune surse de contaminare sunt carnea de vită, de pasăre, de porc şi ouăle. Ouăle pot fi contaminate prin microfisurile din coajă sau infecţia este transovariană din ovarul sau din oviductul infectat. La acest nivel, sacul vitelin (gălbenuşul) este contaminat înainte de depunerea cojii. Acest mod de

transmitere este greu de controlat, deoarece găinile outoare sunt asimptomatice. Contaminarea internă a ouălor este produsă, cel mai adesea, de *S. enteritidis*. În carnea de pasăre s-a raportat o incidență crescută a contaminării cu *Salmonella*. Utilizarea masei miceliene după extracția antibioticului, în hrana animalelor, a selectat tulpinile rezistente și a crescut incidența infecțiilor umane prin consumul cărnii contaminate.

Alte surse de infecție sunt laptele și produsele derivate (înghețată, brânzeturi), moluștele din apa contaminată. Infecția poate fi transmisă de animale de casă: câine, pisică, broasca țestoasă.

O altă sursă de infecție o reprezintă *purtătorii* sănătoși sau convalescenți. După infecția clinică unii indivizi continuă să poarte *Salmonella* în țesuturi (în special în vezica biliară) pentru perioade variabile și să elimine agentul infecțios.

În 1991 s-a descoperit un nou gen, *Trabulsiella gnamensis*, asemănător cu *Salmonella*.

7.1.3. Genul *Shigella*

Primul raport despre izolarea și caracterizarea bacteriei care produce dizenteria a fost publicat de K. Shiga la sfârșitul secolului 19. S-au descris 4 specii de *Shigella: Sh. dysenteriae* (subgrupul serologic A), *Sh. flexneri* (subgrupul B), *Sh. boydii* (subgrupul C) și *Sh. sonnei* (subgrupul D). *Sh. sonnei* este agentul etiologic a 2/3 din cazurile totale de shigeloză, restul fiind produse de *Sh. flexneri*. Specificitatea serologică este conferită de polizaharidul regiunii externe a LPS. În funcție de variațiile antigenului O, speciile au fost divizate în serotipuri. S-au identificat peste 40 de serotipuri ale celor 4 specii.

Caractere morfologice. Shigella sp. are necesități de creștere asemănătoare altor enterabacterii, dar este inhibată de microbiota Gram negativă. În culturi pure formează colonii circulare lucioase translucide sau ușor opace și nehemolitice pe geloză sânge. Sunt bacili Gram negativi de dimensiuni medii (2–3 μ lungime și 0.5–0.7 μ grosime), fără flageli și nu formează spori.

Mărimea coloniilor variază în cadrul celor 4 subgrupe. *Sh. sonnei* poate disocia în colonii netede (faza1) plate, cu marginile neregulate și colonii (de faza 2) asociate cu pierderea plasmidei de virulență și cu schimbarea specificității antigenice. Prin subcultivare, coloniile de faza 1 pot trece ireversibil la cele de faza 2, trecerea fiind corelată cu modificarea tipului de colonie de tip S (neted), la colonii de tip R.

Caractere de cultură, biochimice și de metabolism.

Bacilii dizenterici sunt aerobi, facultativ anaerobi, cresc bine pe mediile de cultură uzuale, la temperatura optimă de 37°C (cu limite între 10°C și 45°C), la un pH optim de 7,2. În bulion și apă peptonată, formele "S" tulbură uniform mediul, în timp ce formele R sedimentează.

Pe geloza nutritivă 2% pH 7.2, după 24 de ore de incubare la 37°C, se dezvoltă colonii cu diametrul de 1–3 mm, ușor translucide, convexe sau ușor aplatizate, cu suprafața netedă, cu margini mai mult sau mai puțin regulate. Fac excepție formele "R" care prezintă colonii turtite, suprafața lor având un aspect uscat, ușor încrețit, cu margini foarte neregulate.

Sunt oxidazo-negative, catalazo-pozitive (cu excepția *Sh. dysenteriae* tip 1), glucoza este fermentată fără producere de gaz, cu excepția unor biotiopuri de *Sh. flexneri* 6); nu fermentează lactoza (cu excepția *Sh. sonnei* care o fermentează tardiv); nu pot utiliza citratul și malonatul ca unică sursă de carbon, nu scindează ureea, nu produc hidrogen sulfurat, nu decarboxilează lizina.

Subgrupa A (*Sh. dysentariae*) cuprinde tulpini lactozo-negative, manito-negative. În subgrupul A, serotipul *Sh. dysentariae* tip I (bacilul Shiga) nu produce indol, este catalazo- negativ și nu fermentează ramnoza, în timp ce serotipul *Sh. dysentariae* 2 (bacilul Schmitz) produce totdeauna indol, este catalazo-pozitiv și fermentează aproape totdeauna ramnoza. Majoritatea tulpinilor de *Sh. dysentariae* tip 5 fermentează dulcita și toate tulpinile aparținând serotipurilor *Sh. dysentariae* 7 și 8 produc indol. Serotipul *Sh. dysenteriae* 1 se deosebește de toate celelalte shigelle prin sinteza unei exotoxine cu acțiune predominant neurotropă.

Subgrupa B (*Sh. flexneri*) cuprinde tulpini lactozo-negative care fermentează manita (cu excepția biotipului Newcastle al serotipului 6, a unui biotip manito-negativ al serotipului 4a și rare excepții pentru celelalte serotipuri).

Subgrupa C (*Sh. boydii*) cuprinde tulpini lactozo-negative, care fermentează de asemenea manita (cu foarte puține excepții), dar care se deosebesc de subgrupa B, prin structura lor antigenică.

În subgrupa C, serotipurile 5, 7, 9, 11, 13 și 15 sunt indol pozitive. Ramnoza nu este, în general, fermentată (excepții pentru tulpini ale serotipului 9). Pentru dulcită și xiloză reacțiile sunt variabile (de la un serotip la altul și la tulpinile aceluiași serotip).

Subgrupa D cu specia *Sh. sonnei* cuprinde bacili manito-pozitivi, dar care fermentează lactoza (de obicei tardiv). Tulpinile sunt indol negative și, în general, ornitin-pozitive (uneori și arginin-pozitive).

Habitatul natural este tractul intestinal al omului și al altor primate, la care produce *dizenteria bacilară*. Creșterea este optimă în aerobioză, dar bacteria este facultativ anaerobă.

Enterobacteriile din grupul *Shigella* se găsesc în intestinul și scaunul bolnavilor de dizenterie și ale purtătorilor temporari sau cronici. Dintre animale, în mod natural se îmbolnăvesc maimuțele, care de asemenea pot elimina bacilii dizenterici. Timpul de generație este de aproximativ 40 minute, iar perioada de incubație este, în medie, 3 zile. Calea de contaminare este fecal-orală, prin ingestia hranei sau apei contaminate.

Toate cele 4 subgrupe de *Shigella* au fost izolate în țări tropicale și subtropicale din toată lumea. În ultimii 30 de ani, *Sh. dysenteriae 1* a determinat epidemii majore în America Centrală (1969–1970), Africa de est (1991), iar *Sh. boydii* este mai frecventă în sudul Asiei și Orientul Mijlociu; în Europa și America de Nord predomină *Sh. sonnei* urmată de *Sh. flexneri*.

Structura antigenică. Antigenul major al shigellelor este cel somatic lipopolizaharidic "O", termostabil. La tulpinile de *Sh. dysenteriae* și *Sh. boydii* neaglutinabile a fost descris un material capsular (Ewing 1986, Rowe 1990).

Sh. dysenteriae eliberează o exotoxină termolabilă (toxina Shiga) cu acțiune toxică asupra mucoasei și vililor, dar și neurotoxice. Toxina Shiga are o greutate moleculară de 50–1000 kDa, difuzează extracelular, este foarte puternică și are un grad înalt de specificitate. Cauzează leziuni locale hemoragice care duc la sângerări și secreții mucoase masive.

Toxina Shiga este alcătuită din 2 subunități, A (enzimatică) și B (de legare), într-o proporție de 1:5 și produce efectul *citotoxic*: subunitatea B leagă glicolipidele celulelor colonului, iar domeniul A este internalizat prin endocitoza mediată de receptori și inactivează ireversibil subunitatea ribosomală 60S, efectul fiind necroza celulelor prin inhibarea sintezei proteinelor.

Efectul *enterotoxic*: toxina Shiga blochează absorbția electroliților, glucozei și a aminoacizilor din lumenul intestinal, aderând la receptori ai enterocitelor intestinului subțire.

Efectul *neurotoxic*: febra și crampele abdominale sunt considerate semne de neurotoxicitate.

Sh. flexneri și într-o măsură mai mică *Sh. sonnei* sunt endemice și produc majoritatea infecțiilor. *Sh. dysenteriae* produce focarele epidemice și cea mai severă formă de dizenterie.

Infecția cu *Shigella* este aproape totdeauna limitată la tractul gastrointestinal. Rareori traversează peretele intestinal și trece în sânge. 10^3 celule produc infecția (10^5–10^8 celule de *Salmonella* și *Vibrio*).

Shigella se transmite pe cale fecal-orală, prin ingestia alimentelor sau a apei contaminate. Bacteria este foarte infecțioasă: 10-100 celule de *Sh. flexneri* sunt suficiente pentru a iniția procesul infecțios, pentru că supraviețuiește acidității gastrice și inhibă sinteza peptidelor antimicrobiene, efectori anti-infecțioși importanți secretați de celulele mucoasei tractului digestiv. După ce trece de stomac și de intestinul subțire, *Shigella* ajunge în colon, unde este inițiat procesul infecțios propriu-zis. *Shigella* invadează celulele cu vili ale colonului, se multiplică și produc abcese și ulcerații ale mucoasei (scaunele sunt afecaloide, muco-sangvinolente, prezintă leucocite, hematii). Invazia se limitează la mucoasa coloniului, dar bacteriile nu trec dincolo de epiteliu, în lamina propria, nu perforează intestinul și nu invadează sângele.

Infecția parcurge mai multe etape:

– *Sh. flexneri* nu invadează polul apical al enterocitelor, dar traversează stratul celulelor epiteliale, fiind înglobată de celulele M și eliberată prin transcitoză într-o pungă intraepitelială unde macrofagele rezidente din țesutul limfoid asociat mucoaselor, fagocitează și degradează materiale străine (fig. 147). După ce sunt endocitate, celulele bacteriene rezistă în interiorul macrofagului prin liza fagosomului și prin inducerea

apoptozei celulare. Apoptoza macrofagelor este însoțită de eliberarea IL-1, care recrutează PMN şi duce la infiltrarea masivă a țesutului infectat. Moartea macrofagelor este însoțită de eliberarea citokinelor proinflamatorii (IL-1 ß şi IL-18). Ambele stimulează inducerea răspunsului inflamator acut şi intens. IL-18 activează celulele NK şi stimulează sinteza IFN γ (fig. 148);

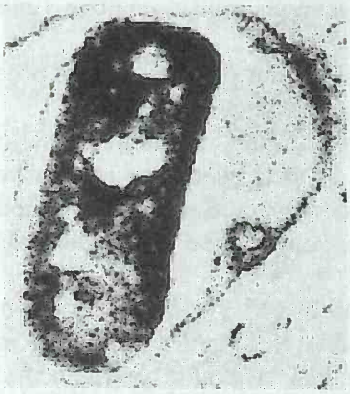


Fig 147. Imagine electrono-optică a unei celule bacteriene de *Shigella* în endosomul macrofagului.

Fig. 148. Evidențierea prin microscopie electronică de *scanning* a cozilor de actină formate adiacent celulelor de *Shigella* internalizate med.mui.ac.ir/slide/bactrio/bactrio3.html.

- *Sh. flexneri* eliberată din macrofage, aderă prin *adezine* tip invazine (*invasion plasmid antigens* = Ipa*; surface presentation antigens* = Spa*; membrane excretion proteins* = Mxi*; virulence proteins* = Vir) şi invadează polul laterobazal al enterocitelor prin inducerea fagocitozei, lizează fagosomul, trece în citoplasmă după circa 15 minute şi se multiplică. Liza membranei fagosomului nu este dependentă de pH acid, ci este mediată de proteine translocate din celula bacteriană, direct în membrana țintă prin sistemul de secreție de tip III. La 37°C, proteina VirF induce sinteza proteinei VirB care activează expresia genelor *ipa, mxi* şi *spa* care codifică sinteza unui complex proteic denumit *translocon Mxi-Spa.* Compexul *Mxi-Spa* se activează la contactul bacteriei cu membrana enterocitului şi secretă invazinele IpaB, IpaC şi IpaA care activează căile de semnalizare ale gazdei şi declanşează *endocitoza.* După ce sunt internalizate, celulele scapă din endosom prin intermediul proteinelor Ipa, componente ale complexului de transport de tip III, care transferă în celula gazdă moleculele efectoare ale activării programului apoptozei;
- se deplasează prin polimerizarea orientată a actinei şi se disemineză în celulele adiacente, evitând astfel contactul cu efectorii imunitari (fig. 148).
- invazia celulelor epiteliale stimulează răspunsul inflamator, cu recrutarea masivă a neutrofilelor în focarul infecțios. Neutrofilele extravazate lezează stratul enterocitelor, permițând bacteriilor luminale să ajungă direct în submucoasă, fără să traverseze celulele M. Distrugerea severă a epiteliului mucoasei tulbură absorbția apei, a nutrienților şi a electroliților. Astfel se produce diareea apoasă, sanguinolentă şi mucilaginoasă a shigelozei. În final, neutrofilele recrutate în focar fagocitează şi omoară celulele bacteriene, procesul infecțios fiind, de cele mai multe ori, autolimitant (fig. 149).

Spre deosebire de speciile de *Yersinia*, care au localizare extracelulară, speciile de *Shigella* sunt predominant localizate în interiorul celulei. Strategia mecanismului de virulență este, ca şi în cazul speciilor de *Yersinia*, activitatea sistemului de secreție de tip III.

Proteinele inductoare ale apoptozei macrofagelor, cu rol determinant al invazivității bacteriei, sunt secretate pe calea sistemului III. Invazivitatea bacteriană în macrofagele foliculilor limfoizi este condiționată de secreția a 4 proteine: *Ipa A, Ipa B, Ipa C, Ipa D.* Înainte de contactul cu celula țintă, *Sh. flexneri* depozitează în citoplasmă proteinele Ipa, iar după contactul cu ținta celulară, le transferă în celula gazdă prin sistemul de secreție de tip III.

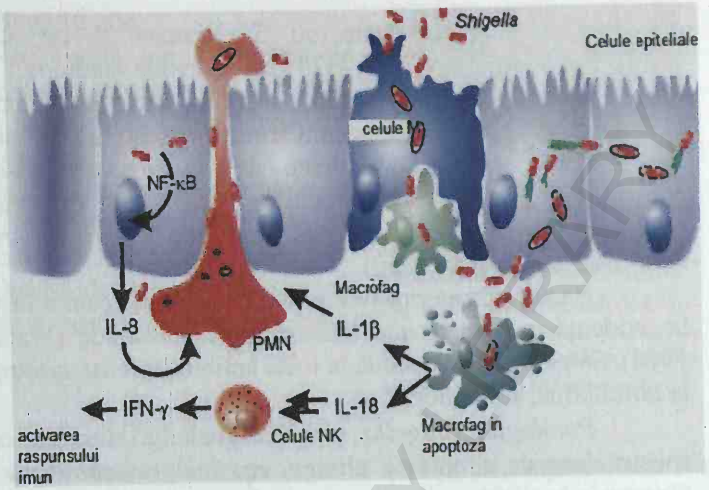


Fig. 149. Mecanismele patogenității la *Shigella* ssp. *S. flexneri* traversează bariera epitelială prin transcitoză la nivelul celulelor M și întâlnește macrofagele rezidente. Bacteria induce apoptoza macrofagelor și apariția unui raspuns inflamator. Celulele bacteriene eliberate din macrofagul lizat invadează celulele epiteliale la polul bazolateral, pătrund și se deplasează în citoplasmă prin polimerizarea directă a actinei și invadează celulele adiacente. Citokinele proinflamatorii produse de macrofage și celulele epiteliale invadate activează răspunsul imun înnăscut ce implică celulele NK și atrag polimorfonuclearele. Afluxul PMN dezintegrează bariera epitelială, exacerbează infecția inițială și distruge țesutul, facilitând astfel invazia bacteriană. În final, PMN fagocitează și omoară bacteriile, astfel că leziunile apărute sunt autolimitate (adaptare după Gunnar, 2008).

Pe lângă cele 4 proteine Ipa, în supernatantele culturii de *Sh. flexneri* s-au detectat cel puțin alte 6 polipeptide. Proteinele secretate nu au secvență semnal N-terminală și toate sunt secretate fără prelucrare N-terminală.

Chiar dacă inflamația masivă inițială favorizează tranzitul bacteriilor luminale în submucoasă, se pare că ulterior *Sh. flexneri* secretă molecule care inhibă semnalele proinflamatorii, probabil pentru a echilibra severitatea infecției la un nivel benefic pentru agentul patogen.

Stimularea semnalizării celulare. După ce ajunge în submucoasă, prin transcitoză din celulele M, *Shigella* invadează polul latero-bazal al celulelor mucoasei intestinale, fără specializare funcțională de a endocita. *Sh. flexneri* interacționează cu celula gazdă, ca și *Salmonella*, cu microdomeniile bogate în colesterol ale membranei plasmatice. Colesterolul este ubicuitar în membrana celulelor eucariote și îi influențează proprietățile biofizice, conferindu-i rigiditate. Colesterolul nu este distribuit unitar în membrană, ci este concentrat în anumite microdomenii bogate în fosfolipide și proteine denumite *pontoane* (*rafts*) *lipidice*. În microdomeniile lipidice, proteinele membranare au o distribuție asimetrică, unele fiind recrutate preferențial, iar altele, excluse. Proteinele asociate pontoanelor lipidice au conexiune funcțională strânsă cu citoscheletul de actină, ceea ce le conferă calitatea de a controla căile de transducție a semnalelor, cum ar fi endocitoza, traficul intracelular al veziculelor, activarea limfocitelor consecutivă legării epitopului, apoptoza. Rolul central al pontoanelor lipidice în rețeaua de semnalizare a celulei eucariote, le face să devină ținte primare pentru agenții infecțioși care invadează celule nespecializate pentru fagocitoză și în mod obișnuit endocitează macromolecule în soluție, așa cum sunt enterocitele.

Patogeneza. Deși bacteriile extracelulare de *S. flexneri* sunt imobile, cele intracelulare dobândesc *fenotipul "organelle-like movement"* (Olm) care permite celulei bacteriene să „alunece" de-a lungul filamentelor de actină în celula infectată, iar fenotipul *Ics* (*i*ntracellular *s*preading) permite bacteriilor să se disemineze extracelular și să infecteze alte celule. Produsul genei icsA determină polimerizarea actinei la polii enterocitului și apariția unei protruzii sau cilindri de actină prin care bacteriile se deplasează în alte celule, evitând mediul extracelular, în care bacteriile devin imobile.

Invazia intracelulară produce microabcese ale mucoasei în intestinul gros, urmată de degradarea epiteliului și inflamația laminei propria, descuamarea, ulcerații ale mucoasei, sângerare și formarea unei pseudomembrane pe aria ulcerată, alcătuită din fibrină, leucocite, resturi celulare și bacterii.

După autoliză, celulele de *Shigella* eliberează LPS, cu efect iritant asupra mucoasei. Mecanismul molecular al inducerii diareii nu este cunoscut. Faza apoasă pare a fi indusă de enterotoxinele (ShET) 1 și 2, termolabile. Toxina Shiga produsă de *Sh. dysenteriae* induce efecte citopatice la o varietate de celule *in vitro*, iar *in vivo* produce leziuni vasculare în colon, rinichi și în SNC (Schroeder și colab., 2008). *Enterotoxina* produce diaree, inhibă absorbția glucozei și aminoacizilor în intestinul subțire, este antigenică și induce sinteza anticorpilor neutralizanți. Exotoxina acționează și asupra SNC și amplifică severitatea infecției. Anticorpii nu sunt protectori pentru o reinfecție ulterioară.

Persoanele infectate cu *S. flexneri* şi cu anumite predispoziţii genetice (HLA-B27) pot dezvolta sindromul Reiter (dureri articulare, iritaţii oculare, disurie), care poate dura luni până la ani de zile şi poate genera artrita cronică greu de tratat.

Toate tulpinile virulente de *Sh. flexneri* posedă o plasmidă de virulenţă de dimensiuni mari (230 kb) denumită *plasmidă de invazie*, codificatoare pentru toţi factorii de virulenţă enumeraţi mai sus (fig. 150).

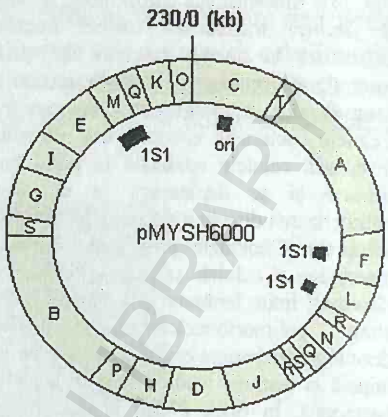


Fig. 150. Harta genetică a plasmidei de *Sh. dysenteriae.*

Bacilii dizenterici sunt primele bacterii la care a fost pusă în evidenţă multirezistenţa transmisă prin plasmide (Watanabe, 1960). *Shigella* este sensibilă la toate antibioticele cu spectru larg, la polimixine, sulfamide.

Patologie. Shigella produce maladia diareică cu un spectru larg de simptome clinice, cea mai severă formă fiind dizenteria bacilară, o diaree sanguinolentă originară în colon. *Sh. dysenteriae* serotip 1 numit şi bacilul Shiga, este singurul agent dizenteric care produce o toxină puternică, generând cea mai gravă formă de dizenterie (cu crampe abdominale intense, febră, 20–100 scaune pe zi cu mucus şi sânge sau chiar hemoragie, cu deshidratare intensă, simptome nervoase). Infecţia este autolimitată, dar poate periclita viaţa persoanelor cu deficit al funcţiei imunitare. La copii poate apărea complicaţia sindromului hemolitic uremic (SHU), datorită creşterii bruşte a temperaturii şi modificărilor metabolice induse de toxina Shiga.

Rehidratarea asociată cu antibioticele sunt măsuri eficiente de tratament al procesului infecţios.

Shigeloza este endemică în ţările în curs de dezvoltare, dar focarele apar în ţările dezvoltate, în condiţii de igienă precară. Cei mai sensibili sunt copiii sub 5 ani. Invazia bacteriană a mucoasei colonului este o treaptă esenţială în patogeneza shigelozei.

Diagnosticul etiologic este bacteriologic. Cea mai bună metodă de recoltare este tamponul rectal. Pentru reuşita izolării este important de reţinut că vitalitatea bacililor dizenterici în scaun, după recoltare, este de scurtă durată, datorită sensibilităţii la fagii specifici şi la antagonismul exercitat de microbiota normală; de aceea, însămânţarea se face cât mai repede, în maxim 1 oră de la recoltare. Tulpinile genului *Shigella* sunt bacili Gram negativi, imobili, care cresc bine pe medii cu bilă (fig. 151). Coloniile *negative pentru lactoză* (fig. 152) se transferă pe mediul TSI (*t*hree *s*ugars *i*ron): nu produc H_2S, nu fermentează lactoza în 24 ore, acidifică coloana de mediu fără producere de gaz şi alcalinizează mediul înclinat (panta). Se pot însămânţa medii selective care inhibă creşterea altor enterobacterii şi a bacteriilor Gram pozitive (fig. 153).

Fig. 151. Evidenţierea imobilităţii în geloza 3‰.

Fig. 152. Aspectul coloniilor bacteriene pe mediu diferenţial AABTL (agar-albastru de brom timol-lactoză)

Fig. 153. Aspectul coloniilor bacteriene pe alte medii diferenţiale.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În ser, anticorpii aglutinanți apar după 10 zile.

Shigella se transmite pe cale fecal-orală, de la persoanele infectate la cele sănătoase, prin alimente și apă contaminate. Infecțiile se produc mai ales la copiii mai mici de 10 ani. După vindecare, pacientul elimină bacili o perioadă scurtă de timp.

Vaccinurile vii orale au dat rezultate bune experimentale pe animale și voluntari, demonstrând că imunitatea antidizenterică are specificitate de serotip, dar nu este protectoare față de infecții viitoare cu alte serotipuri. sIgA, a cărei sinteză este indusă de vaccinul viu atenuat, administrat pe cale orală, pare a fi importantă pentru limitarea procesului infecțios.

Fig. 154. Aspectul culturii de *Citrobacter freundii* (sus) și *Enterobacter cloacae* (jos) pe mediu lactozat (colonii lactozo-pozitive).

7.1.4. *Citrobacter freundii* – LAC+ (fig. 154), ONPG+, H_2S+, LDC-. Este patogen oportunist, responsabil de infecții urinare, septicemii, suprainfecții ale tractului respirator. Nu are potențial enteropatogen.

7.1.5. Genurile *Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia* (KEHS) constituie grupul de enterobacterii VP pozitive, sunt patogeni oportuniști (terapie intensivă, urologie, reanimare) mai ales din cauza multirezistenței la antibiotice.

Fig. 155. Aspectul culturii de *Klebsiella pneumoniae* pe mediu lactozat (colonii mucaose, lactozo-pozitive).

Genul *Klebsiella* conține specii imobile, care formează colonii de aspect particular, foarte mucoase (fig. 155), fermentează un număr mare de glucide, posedă ca factori de virulență antigenul capsular K (77 tipuri diferite) cu rol antifagocitar și protector față de acțiunea letală a serului. Serotipurile capsulare K_1 și K_6 sunt potențial patogene.

Genul *Klebsiella* – cuprinde 3 specii:

K. pneumoniae – cea mai importantă pentru patologia umană și animală, agent al unor pneumonii mortale în perioada 1882-1884; *Klebsiella pneumoniae* provoacă mastite la bovine, abcese la maimuțe, infecții generalizate, cu mortalitate crescută la lemurieni; la cai, sperma este contaminata cu serotipurile K_1, K_2, K_7, K_{30}, care pot produce la femele metrite, avorturi.

K. ozaenae (antigenul K_3) produce infecții ale tractului respirator, adeseori cu tendință de cronicizare;

K. rhinoscleromatis este agentul unor rinite cronice.

Sunt bacterii foarte răspândite în mediul extern (în sol, apă, pe plante) și prezente la un procent mic de indivizi (5%) sănătoși pe mucoasa tractului respirator superior (TRS), puțin mai frecvente în colon. Cresc foarte bine pe medii simple. *Klebsiella* produce 1% din infecțiile pulmonare, iar ocazional, ITU. *K. pneumoniae* și *K. oxytoca* produc >10% din infecțiile nosocomiale (infecții supurative, urinare, respiratorii, biliare) apărute mai ales la imunodeprimați (neoplazici, arși, cirotici, diabetici, bătrâni, nou-născuți preamatur). Nu sunt enteropatogene.

Tulpinile *capsulate* (infecțioase) formează colonii tipice, de 3-4 mm în diametru, mucoide (M) strălucitoare (în tuburi așezate vertical, curg pe suprafața mediului); bulionul devine vâscos și cultura formează un inel la suprafață.

Cel mai important reprezentant al genului este *K. pneumoniae* (bacilul Friedlander). De obicei se izolează de la pacienții cu pneumonie, dar poate infecta și alte organe, în special tractul urinar și rănile deschise.

K. pneumoniae fermentează lactoza, este imobilă (nu produce antigenul H); pe mediu solid tulpinile capsulate dau colonii opace și mucoide, sunt virulente pentru om și pentru animalele de experiență. Tulpinile necapsulate sunt nevirulente, mai mici și translucide.

K. pneumoniae produce antigen *O* (somatic) și antigenul *K**.

*Antigenul polizaharidic (K) al bacililor enterici a fost descris la o tulpină de *K. pneumoniae*.

Antigenul O este un polimer de unități oligozaharidice al câtorva monozaharide. Sunt cel puțin 8 tipuri de variante antigenice O. Polizaharidul capsular se obține din supernatantele acelulare prin precipitare cu Cetavlon și etanol.

La persoanele sănătoase, rezistența naturală față de *K. pneumoniae* este crescută. Progresia maladiei și prognoza sunt legate de vârstă și de factorii predispozanți. Persoanele sensibile sunt cele de vârstă medie sau vârstnicii cu alte maladii (diabet zaharat, alcoolism, maladia cronică bronhopulmonară).

Infecția pulmonară produce o infiltrare masivă cu PMN, edem amplu, formarea abcesului cu cavitare masivă.

Recuperarea spontană este dependentă de sinteza anticorpilor specifici anti-polizaharid capsular. Anticorpii anticapsulari sunt protectori și foarte eficienți pentru prevenirea infecției experimentale cu *K. pneumoniae*. Anticorpii sunt demonstrabili în ser la 1–2 săptămâni după inițierea infecției. Rolul lor esențial este cel opsonizant, ușurând ingestia agentului patogen de către fagocite.

Infecțiile recurente sunt produse de serotipuri diferite de *K. pneumoniae*.

Factorul esențial al virulenței *K. pneumoniae* este *capsula polizaharidică*, structură care permite rezistența celulei la atacul fagocitelor. Experiențele pe animale au evidențiat că tulpinile capsulate sunt mult mai virulente decât cele necapsulate.

Leziunile pulmonare sunt produse, cel mai probabil, de *endotoxina* bacteriană. Din culturile în mediul lichid ale tulpinilor virulente de *K. pneumoniae* s-a izolat un *complex extracelular toxic*, format din lipopolizaharid (LPS), polizaharidul capsular și proteine. Complexul molecular este letal după injectarea intraperitoneală la șoarece.

Gravitatea infecțiilor cu *K. pneumoniae* netratate la timp (morbiditate, sechele, letalitate) impune practicarea antibiogramei din cultura primară ori de câte ori este posibil. Diagnosticul de tulpină periculoasă și de focar infecțios de spital se bazează pe izolarea de la toți sau aproape de la toți bolnavii, a aceluiași tip. Dacă serotipul nu poate fi identificat datorită lipsei serurilor imune de diagnostic, este suficientă determinarea biotipului.

Genul *Enterobacter* cuprinde 9 specii. *Enterobacter aerogenes* nu este enteropatogen, poate produce infecții ale tractului respirator și genito-urinar, este prezent în sânge, puroi, excepțional în LCR. *Enterobacter gergoviae* este multirezistent la antibiotice, izolat din expectorații, sânge. *Enterobacter cloacae* – patogen oportunist, izolat din urină, expectorații, lichid pleural, rar din sânge și LCR.

Serratia marcescens/liquefaciens este multirezistentă la antibiotice; produce hemolizine, proteaze, siderofori, nu este enteropatogen, este patogen oportunist, apare în infecții urinare sau respiratorii, diferite supurații, căi biliare, septicemii.

7.1.6. Grupul *Proteus Morganella Providencia*

reunește specii TDA^+, FAD^+. Structurile implicate in virulență sunt reprezentate de *proteine de membrană externă* (OMP) implicate în aderență, mitogene pentru limfocitele B; *fimbrii,* cu rol în aderența la țesutul epitelial: MR/P, MR/K-*like*, prin care aderă la capsula glomerulară; ATF (*ambient temperature fimbriae*), UCA (*uroepithelial cell adhesion*) – fimbriile de tip 1 similare celor de *E. coli* și fimbrii de tip P; *flageli* cu rol în ascensiunea infecțiilor urinare; *urează*, *Ag H* foarte variabil; *lgA-proteaze*; *TDA,* care generează proteine cu α-cetoacizi ce acționează ca agenți chelatori de Fe.

Caracteristici antigenice:

Antigenele de grup au semnificație practică în reacția de serotipizare.

Tulpinile de *Proteus* „O" (Ox19, Ox2, Oxy) sunt utilizate în reacția Weil-Felix pentru diagnosticul infecțiilor rickettsiene. Capsula conține acizi uronici, acid piruvic, grupări fosfat cu caracter acid, ce pot lega Mg^{2+} și favorizează formarea calculilor renali,

Patogeneză: infecții minore (urează = factor de patogenitate), plăgi suprainfectate, septicemii, meningite purulente neonatale.

g. Proteus

Genul *Proteus* este larg răspândit în mediul înconjurător și face parte din microbiota normală a tractului gastrointestinal uman. Deși *E. coli* produce cele mai multe cazuri de cistite necomplicate, pielonefrite și prostatite, speciile de *Proteus* reprezintă a treia cauză a acestor infecții, în special a celor nosocomiale. *P. vulgaris* produce infecții pulmonare, ITU, bacteriemie numai atunci când dobândește o localizare extraintestinală. Sub acțiunea *ureazei* pe care o produce, *P. vulgaris* eliberează NH_4 și

alcalinizează ureea, fără posibilitatea acidifierii, favorizând formarea calculilor. Este un agent patogen nosocomial important. Specia *P. mirabilis* determină infecții nosocomiale și este frecvent izolată în laboratoarele de microbiologie clinică.

Unele studii atribuie potențial enteropatogen speciilor de *Proteus mirabilis* și *P. penneri*.

P. mirabilis este agentul unor bacteriemii, osteomielite, precum și al meningoencefalitei neonatale. S-a dovedit implicarea *P. penneri* într-un caz de bacteriemie concomitent cu un abces subcutanat femural la un pacient neutropenic cu leucemie limfocitară acută și într-o urosepticemie nosocomială la un pacient cu diabet.

Studii recente sugerează ca *Proteus mirabilis* poate fi implicat în etiologia unor artrite reumatoide (la pacienții cu artrite reumatoide s-a identificat frecvent infecția urinară cu densitate mare a celulelor de *Proteus*).

Tulpinile *P. mirabilis* indol-negative sunt, în general, mai sensibile la antibiotice decât cele indol-pozitive (*P. vulgaris, P. penneri* și *P. hauseri*).

Chow (1979) raportează o epidemie de *P. mirabilis* cu tulpini rezistente la ampicilină, cefalotin, tetraciclină, cloramfenicol, carbenicilină, colistin, trimetoprim-sulfametoxazole, streptomicină și aminoglicozide.

Tulpini clonale de *P. mirabilis* rezistente la gentamicină și clorhexidină (un antiseptic utilizat și ca dezinfectant al mâinilor, dar și în calitate de conservant), ca și la alți agenți antimicrobieni, sunt frecvent izolate din cazuri de infecții urinare, de obicei diseminate de la pacienți cateterizați. *P. mirabilis* sensibil la tetraciclină a fost izolat din bacteriemii și meningite la nou-născuți.

P. penneri este, în general, mai rezistent la penicilină decât *P. vulgaris*, iar în privința profilului său de sensibilitate se aseamănă mai mult cu *Morganella morganii*, decât cu *P. vulgaris*. Această specie este, în general, sensibilă la cefotaxim, la cefalosporine cu spectru larg (ceftriaxon, ceftizoxim și ceftazidina), cefepime, aztreonam, aminoglicozide, ciprofloxacin, tazobactam și imipenem, și poate fi rezistentă la cefazolin, cefprozil, cefuroxim, cefamandol, cefdinir, cefoperazon, loracarbef, ampicilină și ureidopeniciline.

Genul *Providencia*

Providencia sp. și *Citrobacter* sp., membri ai microbiotei normale, produc ITU și chiar septicemii.

Semnificație clinică. Speciile genului *Providencia* au fost izolate din urină, spută, sânge, exudate faringiene și din plăgi. *Providencia heimbachae* și *Providencia rustigianii* au fost izolate de la pinguini.

P. stuartii a fost identificată ca agent patogen pentru pacienții cu catetere urinare din sanatorii. 21% dintre infecțiile tractului urinar se datorează fie *P. mirabilis*, fie *P. stuartii*. *P. rettgeri* este implicată în infecțiile nosocomiale, dar cu o incidență mult mai mică.

Teoretic, toate speciile de *Morganella, Providencia,* ca și *Proteus vulgaris, Proteus penneri* sunt capabile să producă β-lactamaze inductibile care hidrolizează penicilinele și cefalosporinele. Din aceste motive sensibilitatea tulpinilor de *Providencia* izolate din clinică trebuie să fie permanent monitorizată.

Genul *Morganella*

M. morganii este un patogen oportunist, un agent etiologic al diareii călătorilor, la pacienți cu afecțiuni gastrointestinale, septicemii neonatale, abcese cerebrale, tubo-ovariene, corioamniotite, piomiozite și meningite la indivizi imunocompromiși.

Ca și *Providencia, Morganella* produce β-lactamaze și este în general rezistentă la cefalosporine și ampicilină (fig. 156).

Testele de antibiosensibilitate automată sunt inadecvate pentru caracterizarea mecanismelor de rezistență bacteriană, putând să furnizeze rezultate de sensibilitate falsă. Testarea cu aztreonam poate indica eronat rezistența deoarece alungirea celulelor chiar înainte de liză poate fi interpretată de aparat ca fiind rezultatul creșterii.

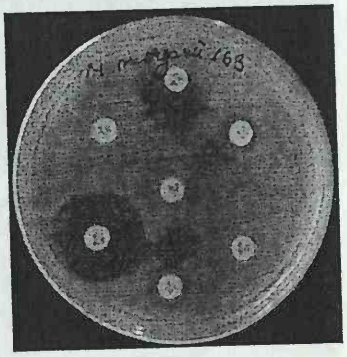


Fig. 156. Tulpină de *Morganella morgani* producătoare de ESBL, se remarcă sinergismul de acțiune între β-lactamice (peniciline, cefalosporine) și acidul clavulanic.

7.1.7. Genul *Edwardsiella* – specia *tarda* nu este comensală a tractului digestiv (rezervorul este reprezentat de reptile şi peşti), prezintă caractere biochimice similare cu *Salmonella*, este producătoare de H_2S, dar produce indol şi are profil diferit de fermentare a zaharurilor. În zonele tropicale, este enteropatogenă şi izolată în mod excepţional din sânge, urină, LCR la imunodeprimaţi.

7.1.8. Genul *Levinea (Citrobacter) malonatica* / (C.) *amalonatica (us)* reuneşte tulpini diferite de *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Kluyvera* Cit^+, LDC^-, lactoză-negative sau lactoză pozitive tardiv, patogene oportuniste, care pot produce produce septicemii, meningite neonatale cu rată mare de mortalitate, infecţii urinare şi bronhopulmonare. În pediatrie, *L. amalonatica* provoacă diaree la nou-născuţi. Uneori prezintă asemănări antigenice cu *Shigella*, dar nu sunt enteroinvazive.

7.1.9. Genul *Kluyvera* este o specie rareori izolată în clinică, mobilă, $ONPG^+$, VP^-, Ind^+. La om a fost izolată din expectoraţii, urină, bilă, scaune, sânge, puroi, fiind considerată patogen oportunist.

7.1.10. Genul *Buttiauxella* este asemănătoare cu *Kluyvera*, dar diferită genetic, indol-, LDC-, Sac-. Patogenitatea este similară cu cea de la *Kluyvera.*

Testarea sensibilităţii la antibiotice a enterobacteriilor şi raportarea rezultatelor trebuie să aibă în vedere multiplele fenotipuri de rezistenţă naturală şi dobândită, prezente la enterobacterii, mai ales la antibioticele β-lactamice. Raportarea rezultatelor antibiogramei trebuie să ţină cont de asemenea şi de originea produsului patologic. Astfel, în cazul izolatelor fecale de *Salmonella* sp. şi *Shigella* sp., se raportează numai ampicilina, o fluorochinolonă şi biseptolul, iar în cazul izolatelor extraintestinale de *Salmonella* sp., se adaugă o cefalosporină de generaţia a treia şi cloramfenicolul. Pentru *Salmonella* şi *Shigella* nu se raportează rezultatele pentru aminoglicozide, acestea nefiind eficiente *in vivo,* chiar dacă tulpinile manifestă sensibilitate *in vitro* la aceşti agenţi. Pentru izolatele din LCR se raportează numai cefalosporinele injectabile (ceftriaxona, cefotaximul) şi nu cele orale (cefazolin, cefalotin) (CLSI, 2009). Tulpinile de *Klebsiella sp., E coli* şi *Proteus mirabilis* producătoare de β-lactamaze de spectru larg (ESBL) (157–158) şi confirmate prin testele recomandate de CLSI trebuie raportate rezistente la peniciline, cefalosporine, aztreonam, indiferent de rezultatul testării *in vitro* (CLSI, 2009).

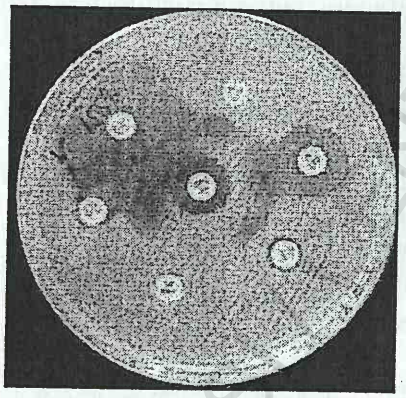


Fig. 157. Tulpină de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL, se remarcă sinergismul de acţiune între beta-lactamice (peniciline, cefalosporine) şi acidul clavulanic.

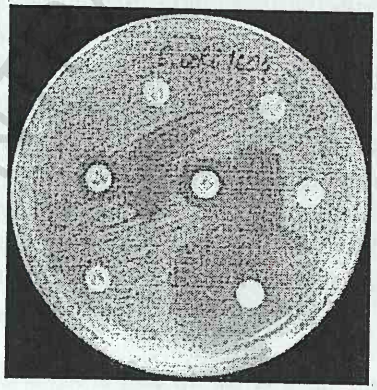


*Fig. 158.*Tulpină de *E. coli* producătoare de ESBL, se remarcă sinergismul de acţiune între β-lactamice (peniciline, cefalosporine) şi acidul clavulanic.

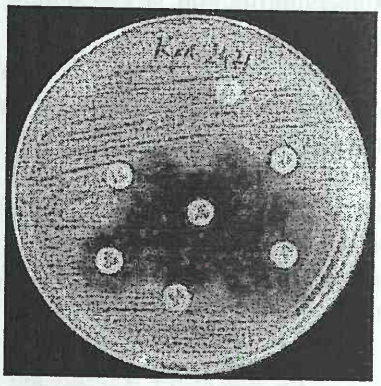


Fig. 159. Tulpină de *K. pneumoniae* producătoare de ESBL. Se remarcă sinergismul de acţiune între β-lactamice (peniciline, cefalosporine) şi acidul clavulanic.

În unele instituţii medicale se recomandă *screening*-ul tulpinilor producătoare de ESBL, la cele izolate din infecţii urinare. Tulpinile de *Citrobacter sp., Serratia* sp. şi *Enterobacter* sp. pot dezvolta rapid rezistenţă la cefalosporinele de generaţia a treia chiar în timpul tratamentului, prin derepresarea genelor pentru enzimele AmpC cromosomale, de aceea se recomandă testarea izolatelor succesive de la acelaşi pacient.

Spre deosebire de ESBL, care sunt enzime sensibile la acidul clavulanic, enzimele AmpC, codificate plasmidial, care conferă același fenotip de rezistență la β-lactamice, nu sunt inhibate de acidul clavulanic: când cele două enzime sunt exprimate simultan, sinergismul între acidul clavulanic și cefalsoporinele de generația a treia este mascat (fig. 160).

Deși nu există încă metode standardizate de detectare fenotipică, totuși tulpinile producătoare de AmpC, spre deosebire de cele producătoare de ESBL, manifestă în general rezistență la cefamicine (cefotetan și cefoxitin).

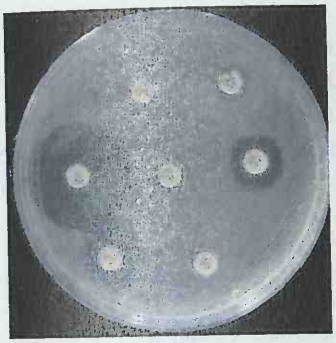


Fig. 160. Tulpină de *E. coli* probabil simultan producătoare de ESBL și AmpC, care maschează sinergismul cu acid clavulanic.

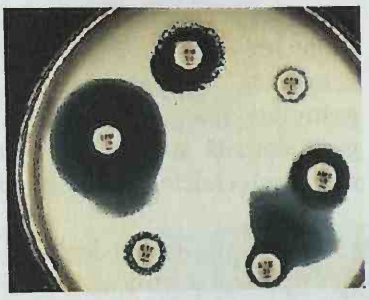


Fig. 161. Tulpină de *Klebsiella pneumoniae* producătoare simultan de ESBL (SHV-12) și carbapenemază (IMP-4) (Poirell și Nordmann, 2004).

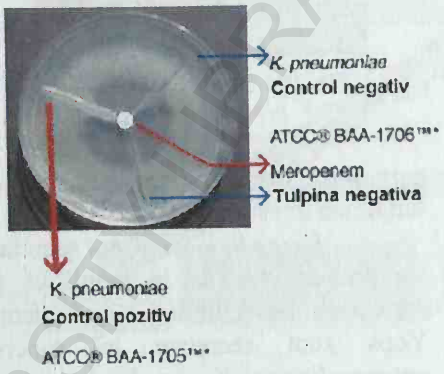


Fig. 162. Testul Hodge modificat (CLSI, 2009). Tulpinile producătoare de carbapenemază generează apariția unei zone de inhibiție cu aspect de treflă.

Pentru unele specii de enterobacterii, s-au constatat rezultate de falsă sensibilitate la anumite cefalosporine, care prin urmare, nu se raportează la speciile respective (de exemplu, *Providencia* la cefprozil, *Morganella* la cefixim, *Citrobacter, Providencia, Enterobacter* la cefnidir și lorocarbef).

Enterobacteriaceele rezistente la cefalosporinele de generația a treia cu valori CMI ridicate sau zone de inhibiție a creșterii reduse la carbapenemi, pot fi producătoare de carbapenemaze, chiar dacă valorile se află la limita superioară a sensibilității (fig. 160–162).

În acest caz se recomandă *screening*-ul producerii de carbapenemază prin testul Hodge modificat sau alte teste bazate pe stabilirea valorii CMI sau *cut-off*. *Proteus sp., Providencia sp., Morganella sp.* pot prezenta rezistență la carbapenemi prin mecanism neenzimatic, așadar testele bazate de stabilirea valorii CMI la imipenem nu sunt adecvate pentru revelarea producerii de carbapenemază.

În cazul evidențierii unei tulpini producătoare de carbapenemază, stabilirea valorii CMI la carbapemeni este obligatorie, aceasta fiind raportată fără interpretare. Clinicianul va fi informat privitor la mecanismul de rezistență pentru a se putea considera un tratament alternativ.

7.1.11. Genul *Yersinia*

Yersinia este o bacterie Gram negativă, cu morfologie de bacili pleomorfi. Celulele se pot colora bipolar. Este microaerofilă, facultativ anaerobă. Testul catalazei este pozitiv, iar al oxidazei negativ.

Gazdele naturale sunt animalele, dar pot produce maladii infecțioase umane: *Y. pestis* – agentul plăgii umane; *Y. pseudotuberculosis; Y. enterocolitica* – agentul unei boli diareice la om.

Y. pestis este un bacil Gram negativ, imobil (fig. 163).

Este facultativ anaerobă, creșterea fiind mai rapidă pe medii suplimentate cu sânge (fig. 164) sau cu alte lichide biologice, la 30°C.

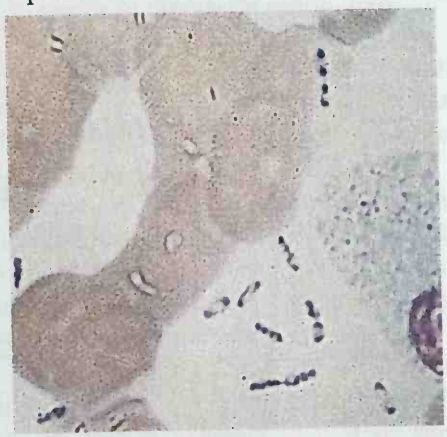


Fig. 163. Secțiune printr-un ganglion infectat cu *Y. pestis*. Celulele bacteriene au aspect caracteristic de ac de siguranță, colorație Wayson (http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/wayson).

Fig. 164. Morfologia coloniilor de *Y. pestis* pe geloză sânge (http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/zoonoses).

Y. pestis este agentul plăgii (ciuma bubonică), infectează rozătoarele şi poate fi transferată la om prin înţepătura puricelui. Pandemiile de ciumă bubonică au marcat istoria omenirii prin milioanele de victime (în Ţara Românească, cea mai mare epidemie de ciumă a fost cea din timpul domniei lui Caragea, din 1813–1814, care a ucis jumătate din populaţia Bucureştiului).

Y. enterocolitica şi *Y. pseudotuberculosis* produc simptome patologice asemănătoare la rozătoare. La om *Y. enterocolitica* produce o diversitate de manifestări gastrointestinale, iar *Y. pseudotuberculosis* poate produce o gastroenterită autolimitată. Ambele pătrund în organism pe cale orală şi traversează bariera intestinală prin celulele M care acoperă foliculii limfoizi pe toată lungimea intestinului.

Factorii de virulenţă secretaţi de *Yersinia* spp. au fost denumiţi *Yops* (*Y*ersinia *o*uter *p*rotein*s*). Denumirea vine de la faptul că proteinele s-au identificat iniţial în membrana externă la *Y. enterocolitica*. Ulterior s-a evidenţiat că proteinele Yops sunt secretate în supernatantul de *Y. enterocolitica* şi *Y. pseudotuberculosis*. Prezenţa lor în supernatant nu se datorează lizei celulare şi nici formării veziculelor membranare.

Efectul antifagocitar este mediat de sistemul de secreţie de tip III şi necesită o proteină cu activitate tirozin-fosfatazică, denumită *Yop H* (*Y*ersinia *o*uter *p*rotein). După contactul bacteriei cu macrofagul, sistemul de secreţie de tip III se activează şi proteinele de virulenţă Yop P/J, H, E, O şi T sunt *injectate* în citosolul celulei ţintă, sistemul de secreţie de tip III fiind numit datorită acestui efect, injectisom (fig. 165). Efectul Yop H şi Yop P/J este o defosforilare rapidă a proteinelor care poartă resturi de tirozină fosforilate în citosolul macrofagului, a căror activitate ar fi necesară pentru fagocitoză (fig. 166). *Yop H* este cea mai activă tirozin-fosfatază cunoscută şi are omologie a secvenţei de aminoacizi în jumătatea C-terminală, cu tirozin-fosfataza eucariotelor. Proteina conferă capacitatea *Y. pseudotuberculosis* de a rezista fagocitozei de către macrofagele cultivate.

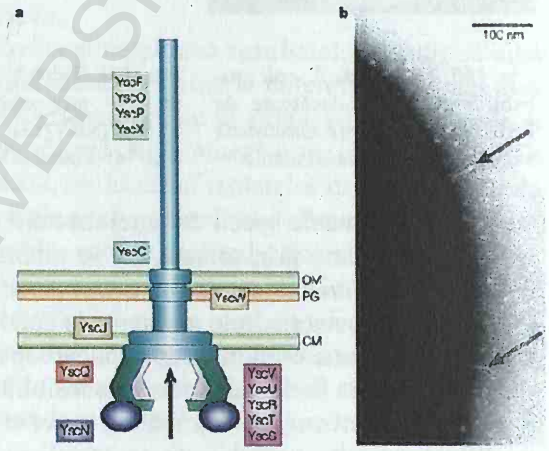


Fig. 165. (a) Reprezentarea schematică a structurii injectisomului la *Yersinia*. (b) Săgeţile indică acestei structuri evidenţiată prin metoda coloraţiei negative la microscopului electric (Cornelis, 2002)

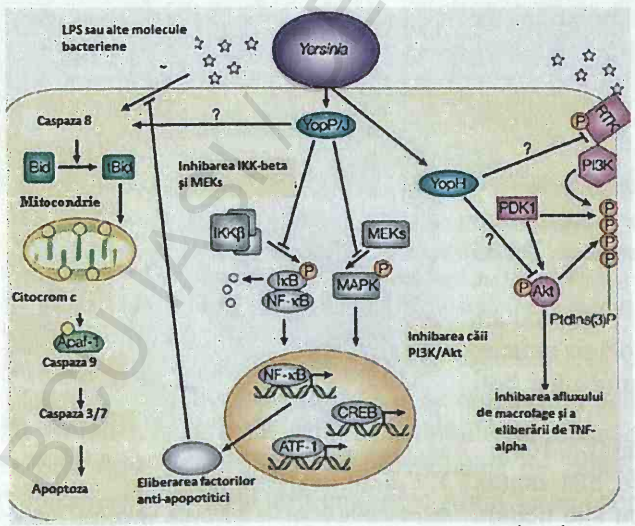


Fig. 166. Modularea apoptozei şi blocarea fagocitozei de către speciile de *Yersinia* (Cornelis, 2002).

Yersinia, inhibitoare a procesului de fagocitoză, produce şi efecte citotoxice în celulele epiteliale *in vitro*. Efectul citotoxic este mediat de alte proteine bacteriene, cea mai importantă fiind *Yop E*, care produce modificări ample ale citoscheletului, care culminează cu ruperea microfilamentelor de actină (fig. 167, 168).

Proteina *Yop E* are efect citotoxic puternic după ce celula de *Yersinia* aderă la suprafaţa celulei eucariote. Citotoxicitatea nu se observă înainte de aderenţă şi nu este mediată de supernatantul care conţine pro-teinele Yops secretate. Înainte de contactul celular, Yop E nu este secretată în supernatant.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

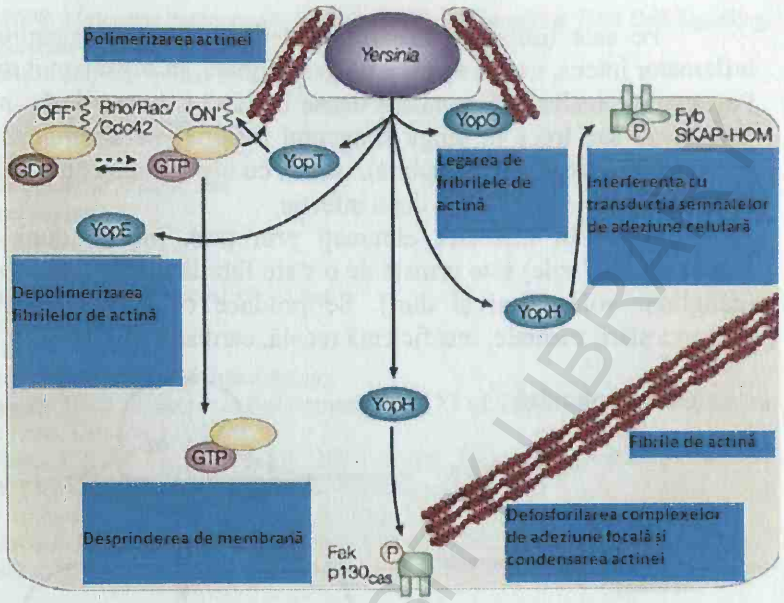


Fig. 167. Depolimerizarea filamentelor de actină de către proteinele Yop (Cornelis, 2002).

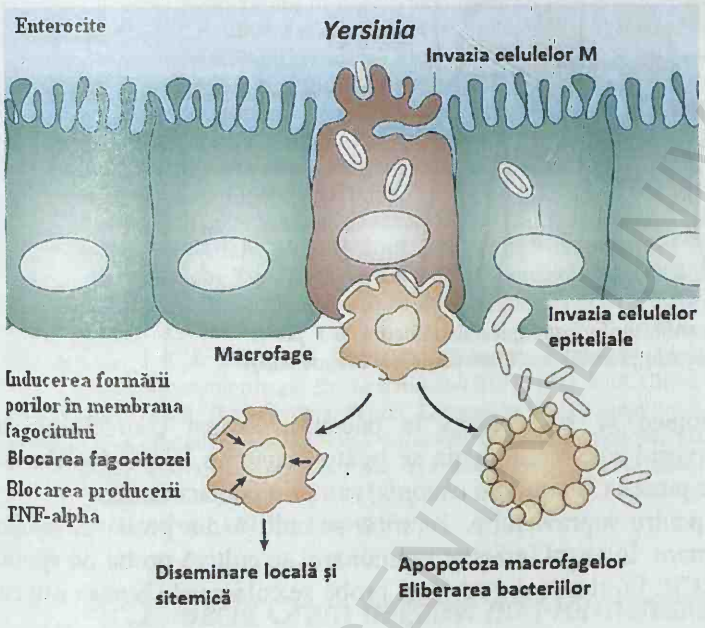


Fig. 168. Invazia barierei intestinale de către speciile de *Yersinia* (Sansonetti, 2004).

Yersinia secretă şi translocă proteinele într-o manieră polarizată: factorii secretaţi sunt translocaţi direct în citosolul celulei ţintă, fără să treacă în mediul extracelular şi nu sunt secretaţi în mediul de cultură tisulară. Genele codificatoare ale proteinelor translocate sunt represate până la întâlnirea cu celula ţintă. La contactul cu celula ţintă, canalul de secreţie se deschide.

Patogeneză. Y. pestis este transmisă de artropode. Puricele se hrăneşte hematofag pe un rozător infectat cu *Y. pestis*. Celulele bacteriene se multiplică în intestinul puricelui, secretă coagulază, enzimă care produce coagularea sângelui ingerat. Cheagul blochează segmentul superior al tubului digestiv (proventriculul) şi tranzitul sângelui aspirat, contaminat cu *Y pestis*, este blocat. Sângele refulează din tractul digestiv al puricelui în leziunea tegumentară produsă de înţepătură.

Toate cele 3 specii patogene de *Yersinia* rezistă factorilor celulari nespecifici de apărare, pentru că inhibă înglobarea de către fagocitele profesioniste. În consecinţă, celule de *Yersinia* sunt localizate în spaţiul extracelular. Celulele bacteriene inoculate sunt fagocitate de PMNN şi monocite. PMNN sunt echipate mai bine pentru a liza *Y. pestis*, dar agentul infecţios rezistă în monocite şi se multiplică. La 37°C, bacteria produce o proteină antifagocitară şi astfel rezistă atacului fagocitelor. Toate cele 3 specii (*Y. pestis*, *Y enterocolitica* şi *Y. pseudotuberculosis*) au tropism marcat pentru ţesutul limfoid.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pe cale limfatică, celulele bacteriene ajung în ganglionii limfatici, unde induc un proces inflamator intens, urmat de necroză ganglionară. În organismul rozătoarelor *Yersinia* persistă în plăcile Peyer, unde realizează populații dense în 12–24 de ore de la infecție. Invazia se poate opri la nivel ganglionar sau trece în sânge şi agentul infecțios se disemineză sistemic, cu leziuni hemoragice şi necrotice în viscere (ficat, splină), uneori cu afectarea meningelui şi a plămânilor. Moartea animalelor infectate survine în 3–4 zile după infecție.

Aerosolii infectați, eliminați prin tuse, produc după inhalare plaga pulmonară primară. Incubarea (2–7 zile) este urmată de o stare febrilă înaltă, limfadenopatie axilară şi inguinală dureroasă (ganglioni voluminoşi şi duri). Se produce coagularea intravasculară diseminată, hipotensiune, alterarea stării mentale, insuficiență renală, cardiacă (fig. 169).

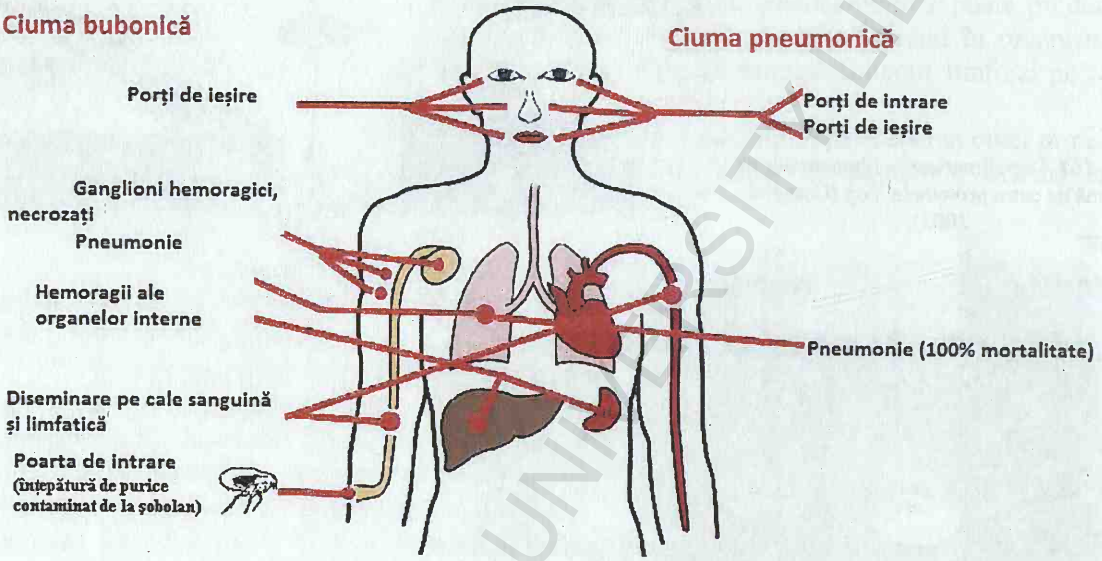


Fig. 169. Localizarea manifestărilor patologice ale infecției *cu Y. pestis* la om (http://people.uwec.edu/piercech/bio/Pnuemonic%20Plague.htm).

Infecția cu agentul plăgii bubonice se suspectează la pacienții expuşi contactului cu rozătoarele în ariile endemice. Din rezervorul sălbatic, infecția se poate transmite la rozătoarele de casă şi la pisică. Infecția este transmisă de purice (*Xenopsylla cheopis*) sau prin contact direct.

Diagnosticul rapid este esențial pentru supraviețuire. *Yersinia* se cultivă din proba de sânge sau din aspiratul ganglionilor cu volum mare. În cazul infecției pulmonare, se cultivă proba de spută, iar din cazurile de meningită, se cultivă LCR. Frotiurile din aceleaşi probe se colorează Giemsa sau cu anticorpi specifici marcați cu fluorocrom.

Infecțiile netratate dau o mortalitate de 50%, iar cele pulmonare, de 100%. *Yersinia* este sensibilă la streptomicină (şi la asociația streptomicină – tetraciclină).

Bibliografie

1. Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1.
2. Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M 100, vol. 29, no. 1.
3. Coburn, B., Sekirov I., Finalay B. B. 2007. Type III Secretion System and Disease – Clin. Micr. Reviews. 20(4): 535–549.
4. Cornelis G. R. 2002. The Yersinia Ysc–Yop 'Type III' weaponry. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 742–754.
5. Croxen M., Finlay B. B. 2009. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology, advance online publication, Published online 7 December 2009 | doi:10.1038/nrmicro2265
6. Darwin K. H., Miller Virginia L. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa – Clin. Micr. Rev.(12) 3: 405–428.
7. Goldberg, M. B. 2001. Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65 (4): 595–626.

8. Gunnar N. Schroeder and Hubert Hilbi*. 2008. Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. Clinical Microbiology Reviews. 21 (1): 134–156
9. Halle T. L. 1991. Genetic basis of Virulence in *Shigella* species .Microbiol. Rev. 55(1): 143–190.
10. http://emu.arsusd
11. http://microblog.me.uk/wp-content/uploads/salmonella_BGA.jpg
12. http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/zoonoses.
13. http://people.uwec.edu/piercech/bio/Pnuemonic%20Plague.htm
14. http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/wayson.
15. http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp
16. http://www.mikrobiyoloji.org/_0.jpg)
17. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n5/images/nrmicro1391-f3.jpg
18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/ Bpathogenesis
19. http://www.necker.fr/u1002/html/team2.html
20. http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/Images/EPEC-pedestal-on-intestinal.jpg
21. Iglewski B. H., Clark VL (eds): Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis. Vol. XI of The Bacteria: A Treatise on Structure and Function. Academic Press, Orlando, FL, 1990
22. Brooks GENUL F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition Jawetz, Melnick şi Adelberg. http:// www.accessmedicine.com
23. Johnson A. GENUL 1994. Molecular Adjuvants and Immunomodulators . Clin. Microbiol. Rev. 7(3): 277.
24. Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection – Clin. Microbiol. Rev. January 4: 80–128 *D.*
25. Jones B. D., Falkow S. 1996. Salmonelosis. Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants .Annu. Rev. Immunol. 14: 533–561.
26. Law D. 1994. Adhesion and its Role in the Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli.* Clin. Microbiol. Rev. 7:153–173.
27. Lu, L. Walker, A. 2008. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium.
28. med.mui.ac.ir/slide/bactrio/bactrio3.html
29. Philippe J. Sansonetti. 2001. Microbes and Microbial Toxins:Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280: G319–G323.
30. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann P. 2004. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48 (1): 15–22
31. s2.hubimg.com/u/1366057_f520.jpg
32. Sansonetti P. J. 2004.War and peace at mucosal surfaces. Nature Reviews Immunology 4, 953-
33. Schroeder GENUL N., Hilbi H. 2008. Molecular Pathogenesis of Shigella spp. Controling Host Cell Signaling Invasion and Death by Type III Secretion – Clin. Microbiol. Reviews 2(1): 134–156.
34. Shin, J.S., Gao, Z. & Abraham, S. N. 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells., *Science. 289*: 785–788.
35. Sinclair, J. F. & O'Brien, A. D. 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-g of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. J. Biol. Chem. 277:2876–2885.
36. Todar K. 2009. The Microbial World. Lectures in Microbiology by Kenneth Todar PhD University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. *Salmonella* and Salmonellosis. textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/
37. Van der Wounde M. W. , Baumler A. J. 2004. Phase and Antigenic Variation in Bacteria. Clinical Microbiol. Rev. 17: 581–611.
38. www.healthhype.com/tag/salmonella)

7.2. Bacili Gram negativi non-fermentativi oportunişti

Pe lângă enterobacterii (numite şi bacili BGF), există o serie de bacili Gram negativi non-fermentativi (BGNF) strict aerobi (care nu fermentează glucoza şi alte zaharuri, dar le degradează pe cale oxidativă) cu rol important în patologia umană (cca. 20 de genuri şi câteva zeci de specii) care adeseori sunt implicate în etiologia infecţiilor oportuniste şi nosocomiale. Reprezentanţii grupului, spre deosebire de enterobacterii, sunt larg răspândiţi în sol şi ape, la animale şi pe plante, în special în habitatele umede.

Morfologia variază de la bacili Gram negativi scurţi şi groşi (trapezoizi) (*Acinetobacter*) la bacili lungi şi fini ca *Ps. aeruginosa*, imobili sau mobili.

BGNF au multiple capacităţi nutriţionale: metabolizează substraturi foarte diverse, ceea ce le permite creşterea pe medii foarte selective (Drigalski, cetrimid) sau minimale (apă, glucoză $(NH_4)_2$, – SO_4, oligoelemente). Pot supravieţui în apă bidistilată, soluţie de heparină, soluţie de substanţe antiseptice şi dezinfectante. Pot fi transmise clonal prin intermediul aparaturii medicale. Virulenţa este mediată de adezine, toxine, capacitatea de a forma biofilme mai ales, de multirezistenţa naturală sau dobândită la numeroase antibiotice, ceea ce explică frecvenţa tot mai mare a infecţiilor nosocomiale (infecţii din mediul spitalicesc) cu *Pseudomonas*. Familia *Pseudomonadaceae* cuprinde genul

USAMV CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pseudomonas cu 256 de specii, împărţite în 4 grupe metabolice şi genul *Xanthomonas*, care alături de *Pseudomonas* formează grupul *pseudomonadelor*. Membrii grupului sunt cunoscuţi mai mult ca patogeni ai plantelor decât ai animalelor, dar trei specii de *Pseudomonas* sunt patogene pentru om.

Cea mai importantă specie este *Ps. aeruginosa*, patogen oportunist care determină infecţii, uneori fatale, la persoanele cu deficienţe ale sistemelor de apărare, la care se adaugă *Alcaligenes xylosoxydans*, *Burkholderia cepacia*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ralstonia pickettii*, *Acinobacter baumannii Stenotrophomonas maltophilia* şi genul *Xanthomonas*.

7.2.1. Pseudomonas aeruginosa

Genul *Pseudomonas* este o bacterie ubicuitară, în sol, pe suprafaţa materiei vegetale, în apele dulci şi marine. Numeroase tulpini se pot dezvolta la temperaturi scăzute (psichrofilie) şi contaminează produsele alimentare sau farmaceutice conservate la rece. Uneori se poate izola din microbiota intestinală a omului şi animalelor.

Izolatele de *Ps. aeruginosa* pot produce trei tipuri de colonii. Izolatele naturale din sol sau apă produc colonii mici de tip R. Izolatele clinice, în general, produc una dintre cele două tipuri de colonii netede (tip S): colonii cu aspect de "ou ochi" (fig. 170), mari, netede, cu marginile aplatizate şi cu profil ridicat, sau colonii cu aspect mucoid, izolate de obicei din secreţiile tractului respirator şi urinar, aspect datorat producţiei de *alginat*.

Ps. aeruginosa creşte pe o mare diversitate de medii şi produce un miros caracteristic de flori de tei. Unele tulpini lizează hematiile. Coloniile sunt netede (S), de culoare verzui-fluorescentă, datorită *piocianinei**, un pigment ce difuzează în agar (fig. 170).

* Piocianina (de la 'piocianeus') se traduce prin 'puroi albastru' caracteristic infecţiilor supurative cauzate de *Ps. aeruginosa*.

Unele tulpini produc *pioverdina*, pigment fluorescent ce colorează agarul într-o nuanţă verzuie (fig. 171), *piorubina* (roşu închis) sau *piomelanina* (pigment negru). *Pioverdina* este produsă în cantitate mare în medii private de Fe.

Fig. 170. Apectul de "ou ochi" al coloniilor de *Ps. aeruginosa* pe geloză sânge (http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/123-4.jpg).

Fig. 171. Culturi pigmentate de *Ps. aeruginosa,* crescute pe mediu Müller Hinton.

BCU IAŞI "ALEXANDRU IOAN CUZA" UNIVERSITY LIBRARY

Ps. aeruginosa este agentul *patogen oportunist* major al grupului. Este foarte frecvent în mediile umede din spitale şi colonizează ca saprobiont organismul uman, dar devine patogen pentru indivizii imunocompromişi, la care poate produce infecţii ale tractului urinar, ale aparatului respirator, ale ţesutului conjuctiv, dermatite, bacteriemii şi o varietate de infecţii sistemice, mai ales la pacienţii cu arsuri severe extinse, cu fibroză chistică sau neoplazici şi la pacienţii SIDA. *Ps. aeruginosa* poate fi de asemenea ocazional fitopatogen.

Ps. aeruginosa este cel mai important agent infecţios nosocomial.

În ape *Pseudomonas* creşte sub formă de biofilme sau de celule libere.

Ps. aeruginosa prezintă o mare variabilitate metabolică. Nu necesită factori de creştere, dar poate metaboliza peste 30 de compuşi organici (fig. 172).

Fig. 172. Galerie de teste biochimice Api 20 NE cu profil de *Ps. aeruginosa* (în a doua parte a galeriei se testează capacitatea bacteriei de a utiliza diferite substraturi ca sursă de C).

Ps. aeruginosa poate fi izolat din sol şi apă, mai ales din mediile de îmbogăţire pentru bacteriile denitrificatoare. Deşi bacteria este aerobă şi niciodată fermentativă, creşte în absenţa O_2, numai dacă NO_3 este prezent în mediu, având rol de acceptor de electroni la capătul catenei de respiraţie. *Ps. aeruginosa* este deseori izolat din apa distilată, dovadă că are necesităţi nutritive foarte simple. Temperatura optimă de creştere este 37°C, însă se poate dezvolta şi la 42°C. Toleranţa la factorii fizici, inclusiv la temperatură, contribuie la succesul său ca patogen oportunist şi mai ales, nosocomial. *Ps. aeruginosa* manifestă totuşi o predilecţie pentru dezvoltarea în medii umede, o reflectare a existenţei sale naturale în sol şi apă.

Pentru identificarea *Ps. aeruginosa* se analizează probe din leziunile tegumentare, puroi, urină, sânge, spută, LCR. Pe frotiu se observă bacili Gram negativi; coloniile sunt adeseori, pigmentate; capacitatea de creştere la 42°C; testul oxidazei este pozitiv; nu fermentează lactoza (fig. 173).

Fig. 173. Cultură lactozo-negativă de *Ps. aeruginosa* pe mediu MacConkey şi CLED.

Gravitatea infecţiilor cu *Pseudomonas* rezidă în absenţa vaccinului şi în *multirezistenţa* la antibiotice, atât naturală, cât şi dobândită. *Rezistenţa naturală* este datorată mai multor factori: *bariera impermeabilă* oferită de membrana externă de LPS; *creşterea în biofilme* care conferă celulelor protecţie faţă de concentraţiile terapeutice de antibiotice; prezenţa *plasmidelor de rezistenţă (R) la antibiotice* şi a *factorilor de transfer al plasmidelor de rezistenţă* (FTR) prin procesul de tranducţie şi conjugare. *Rezistenţa dobândită* se datorează presiunii selective a antibioticelor administrate în clinică. Inutilitatea antibioticelor în tratamentul infecţiilor cu *Pseudomonas* este cel mai dramatic evidenţiată în cazul pacienţilor cu fibroză chistică, infectaţi de obicei cu tulpini multirezistente la toate antibioticele disponibile şi imposibil de tratat.

Pseudomonas este uneori rezident al microbiotei normale umane, deşi proporţia indivizilor sănătoşi colonizaţi cu *Pseudomonas* în afara spitalului este scăzută (rata estimată fiind de 0–24%, în funcţie de situl anatomic). Sursa agentului patogen şi modul de transmitere a *Ps. aeruginosa* sunt deseori incerte datorită caracterului său ubicuitar. *Ps. aeruginosa* este în primul rând un patogen nosocomial.

Patogeneză. Pentru un patogen oportunist ca *Ps. aeruginosa* procesul îmbolnăvirii începe cu alterarea sau evitarea sistemului de apărare a gazdei. Patogeneza infecțiilor cu *Pseudomonas* este multifactorială, fiind sugerată de numărul mare și de spectrul larg al factorilor de virulență, reflectați în gama largă de boli produse de *Ps. aeruginosa*: septicemii, infecții ale tractului urinar, pneumonii și infecții pulmonare cronice, endocardite, dermatite și osteocondrite (Kiska și Gilligan, 2003).

Factorii de virulență sunt numeroși (fig. 174), iar activitățile lor în organismul gazdei sunt redate în tabelul 19.

Tabelul 19.

Activitățile biologice ale factorilor de virulență prezenți la *Ps. aeruginosa*

Factor de virulență	Activitate biologică
Exopolizaharide mucoide (alginat)	Aderență la epiteliu Barieră împotriva fagocitelor și antibioticelor Inhibă legarea anticorpilor și a complementului
Proteaze	Lezarea țesutului Slăbirea joncțiunilor celulelor epiteliale Degradarea fibronectinei Clivarea anticorpilor Inactivarea α1-antitripsinei, componentelor complementului și citokinelor Clivarea receptorilor C3b de pe suprafața neutrofilelor Stimulează secreția de mucus
Exotoxina A	Citotoxică prin inhibarea sintezei proteinelor Toxică pentru macrofage Mitogen pentru celulele T Inhibă proliferarea granulocitelor și macrofagelor
Lipopolizaharide	Determinant antigenic pe suprafața celulei Proprietăți endotoxice mai slabe decât LPS a altor specii Gram negative
Pigmenți: piocianina, 1-hidroxifenazina, pioverdina	Inhibă mișcarea cililor Toxici pentru alte specii bacteriene și celulele umane Stimulează metabolismul oxidativ al neutrofilelor Inhibă proliferarea limfocitelor
Fosfolipaza C	Hemoliză Lezarea țesuturilor Distrugerea surfactantului
Fimbrii (pili de tip IV)	Aderență la epiteliu
Lipaza	Lezarea țesutului
Histamina	Pierderea integrității epiteliului
Exoenzima S	Aderența la epiteliu Citotoxică
Leucocidina	Citotoxică pentru neutrofile și limfocite

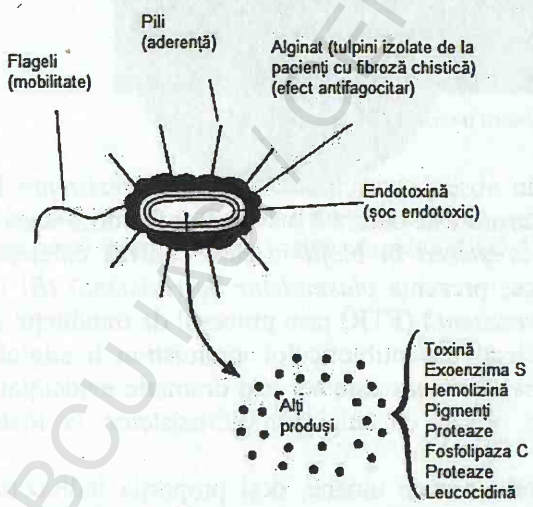


Fig. 174. Reprezentarea schematică a spectrului de factori de virulență prezenți la *P. aeruginosa* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/:1).

Majoritatea infecțiilor cu *Pseudomonas* sunt atât invazive, cât și toxigenice. Infecția cu *Pseudomonas* se desfășoară în trei etape:

- aderența bacteriană și colonizarea;
- invazia locală;
- infecția sistemică generalizată.

Ps. aeruginosa aderă la celulele epiteliale ale tractului respirator superior și ale altor epitelii, prin intermediul *fimbriilor* (pili de tip IV), cu rol esențial în virulență, în mișcarea în tirbușon, în procesele de transformare genetică și în absorbția bacteriofagului. Pilii de tip IV sunt structuri fibrilare lungi, alcătuite dintr-o singură proteină structurală – *pilina*. Pilii, cu o lungime de 1000– 4000 nm, diametrul de 5,2 nm, se pot relaxa sau contracta, prin asamblarea și dezasamblarea subunităților de pilină de la baza pilului. Retracția pilului favorizează mișcarea. Pilina este

codificată de gena pilA din operonul *pil* şi este iniţial sintetizată sub forma unui precursor – prepilina- care este clivat, N-metilat şi asamblat în pilul matur. Fiecare proteină de pilină conţine o regiune pentru legarea de receptor; totuşi regiunile pentru legare se găsesc doar la moleculele de la vârful pilului. Regiunea terminală a pilului pare a fi prima care realizează contactul dintre bacterie şi celulele gazdei. Până la cinci monomeri de pilină sunt expuşi la capătul pilului, rezultând un receptor multivalent, comun pentru interacţiile lectină-carbohidrat.

Adezinele piliare par să se lege la receptori specifici pentru *galactoză, manoză* sau *acid sialic* (fosfosfingolipidele asialo-GM1 şi asialo-GM2) ai membranei celulelor epiteliale. Colonizarea tractului respirator de către *Pseudomonas* pare a fi facilitată de producerea unei proteaze care degradează fibronectina şi expune receptorii de fimbrii de pe suprafaţa celulelor epiteliale sau de leziuni anterioare ale ţesutului. Aceasta din urmă a fost denumită *aderenţă oportunistă* şi are un rol important în infecţiile conjunctivei oculare care produc keratite, în infecţiile tractului urinar şi tractului respirator produse de *Pseudomonas*. Receptorul de la nivelul celulelor traheale pentru pilii de la *Pseudomonas* este probabil acidul sialic (acid N-acetil neuraminic). Tulpinile mucoide care produc exopolizaharide (alginat) au o adezină suplimentară sau alternativă care se ataşează la N-acetil glucozamina din mucusul traheobronşic.

Pe lângă pili şi polizaharidele mucoide este posibil ca *Pseudomonas* să exprime alte două adezine ale suprafaţei celulare pentru a coloniza epiteliul respirator. În plus, este posibil ca exoenzima S legată de suprafaţa celulei să aibă rol de adezină la glicolipidele celulelor epiteliului respirator.

Exopolizaharidele mucoide produse de *Ps. aeruginosa* sunt polimeri de acid manuronic şi glucuronic (*alginat*). Stratul mucos de alginat formează matricea biofilmului care ancorează celulele, iar în focarele infecţioase protejează bacteriile de fagocite, de acţiunea cililor epiteliului tractului respirator, de anticorpi şi de proteinele complementului. Biofilmele formate de tulpinile mucoide de *Ps. aeruginosa* sunt, de asemenea, mai puţin sensibile la antibiotice decât corespondentele lor planctonice.

Capacitatea *Ps. aeruginosa* de a *invada* ţesuturile depinde de rezistenţa sa la fagocitoză şi la alţi efectori ai sistemului imunitar al gazdei, de enzimele extracelulare şi de toxinele care penetrează barierele fizice şi astfel contribuie la invazia bacteriană. Capsula bacteriană sau stratul mucos protejează efectiv celulele de efectul opsonizant al anticorpilor şi complementului şi de fagocite.

Ps. aeruginosa secretă proteaze cu rol de factori de virulenţă, care îşi exercită acţiunea în stadiul invaziv: *elastaza, proteaza alcalină (colagenaza)* şi *fibrinolizina*. Elastaza clivează colagenul, IgG, IgA şi proteinele complementului. De asemenea, lizează fibronectina şi blochează motilitatea cililor. Proteaza alcalină interferă cu formarea fibronectinei şi o lizează. Împreună, elastaza şi proteaza alcalină distrug substanţa fundamentală a corneei şi alte structuri de susţinere care au în structura lor fibronectină şi elastină şi inactivează IFN γ şi TNF.

Ps. aeruginosa produce alte trei proteine solubile implicate în invazie: *citotoxina* şi *două hemolizine*. Citotoxina este o proteină formatoare de pori. A fost iniţial denumită *leucocidină* datorită efectului său asupra neutrofilelor, dar se pare că este citotoxică pentru majoritatea celulelor eucariote.

Citotoxicitatea faţă de epiteliul alveolar pare să se datoreze fosfolipazei, translocată în celule prin sistemul de secreţie de tip III. Liza celulelor alveolare mediază patologia infecţiei cu *Ps. aeruginosa*.

Cele două hemolizine sunt *fosfolipaza C* şi *lecitinaza*. Se pare că acţionează sinergic pentru a distruge lipidele şi lecitina. Citotoxina şi hemolizinele contribuie la invazie prin efectele lor citotoxice asupra celulelor eucariote.

Pigmenţii produşi de *Pseudomonas* sunt de asemenea implicaţi în virulenţă. Pigmentul albastru, *piocianina*, modifică funcţia normală a cililor epiteliului respirator, dezagregă epiteliul şi exercită un efect proinflamator asupra fagocitelor. Un derivat al piocianinei, *piochelina*, are rol de siderofor şi este produs în condiţii de insuficienţă a Fe. Pioverdina nu pare să aibă rol de factor de virulenţă.

Diseminarea. Invazia are loc pe calea curentului sanguin, iar diseminarea bacteriilor din situsurile locale de infecţie este probabil mediată de aceiaşi factori extracelulari care determină colonizarea iniţială deşi nu este clar modul în care se produce infecţia sistemică.

Ps. aeruginosa este rezistent la fagocitoză şi la răspunsul bactericid al serului datorită capsulei sale mucoide şi posibil datorită LPS. Proteazele inactivează complementul, clivează anticorpii IgG şi inactivează IFN, TNF şi probabil alte citokine. Lipidul A al LPS de la *Pseudomonas* mediază manifestările patologice ale septicemiilor Gramnegative: febră, hipotensiune, coagulare intravasculară etc.

Toxigenitatea

Ps. aeruginosa produce două proteine extracelulare: exoenzima S şi exotoxina A.

Bacteria produce substanţe difuzibile, majoritatea având efecte toxice pentru celulele în cultură, animale şi om. Factorii toxici sunt reprezentaţi de endotoxine şi de exotoxine. LPS este mai puţin toxic decât cel al altor bacterii Gram negative.

Exotoxina A (ETA), o proteină termolabilă de 613 aminoazici, este compusul proteic cel mai toxic, în cantitate foarte variabilă, în funcţie de tulpină. Este principalul vector de virulenţă, cu acţiune letală pentru şoarece şi câine şi este mult mai toxică decât LPS. Efectele cele mai ample se produc la nivelul ficatului, cu o reducere a ratei sintezei proteinelor cu cca. 50%. Este un amestec format din *două fosfolipaze C*. Ambele hidrolizează fosfatidil-colina, dar una dintre ele este şi sfingomielinază (Songer, "97). Doza letală a preparatului purificat este mai mică de 1 μg/kg.

Analiza cromatografică a evidenţiat că molecula ETA este organizată în trei domenii:

- domeniul N-terminal, care se leagă de receptorul celular, neidentificat;
- un domeniu intern, de translocaţie;
- domeniul C-terminal, catalitic.

Exotoxina A (ETA) este internalizată prin mecanismul endocitozei mediate de receptori. În endosom este prelucrată proteolitic şi generează fragmentul catalitic C-terminal. Exotoxina A prezintă asemănări structurale şi ale modului de acţiune cu toxina difterică, dar nu poate fi tranformată în anatoxină.

Exotoxina A este parţial identică cu toxina difterică, dar este diferită antigenic. Se fixează pe un receptor diferit al celulei gazdă, dar pătrunde în celule printr-un mecanism asemănător cu cel identificat pentru toxina difterică şi are acelaşi mecanism enzimatic de acţiune, blocând acţiunea factorului 2 de elongaţie al sintezei proteice. Producerea exotoxinei A este reglată de Fe exogen.

Exotoxina A pare să medieze atât manifestările locale cât şi pe cele sistemice produse de *Ps. aeruginosa*. Are activitate necrozantă la situsul colonizării bacteriene. Tulpinile toxigene sunt mai virulente şi produc o formă mai gravă de pneumonie decât cele nontoxigene. Exotoxina A purificată are letalitate ridicată pentru animale, inclusiv pentru primate. Dovada indirectă a rolului exotoxinei A în procesul patologic este adusă de faptul că şansele de supravieţuire ale pacienţilor cu septicemii produse de *Pseudomonas* sunt mai mari la cei care prezintă titruri ridicate ale anticorpilor anti-exotoxină A.

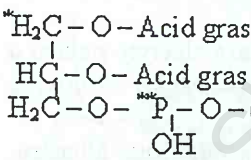
Exoenzima S este probabil o exotoxină de tip A-B cu activitate *ADP-ribozilantă* (pentru o varietate de proteine eucariote) caracteristică exotoxinelor. Exoenzima A este produsă în timpul creşterii bacteriene în ţesuturile lezate şi poate fi detectată în sânge înainte de apariţia bacteriei. S-a sugerat că exoenzima S poate inhiba funcţia fagocitelor din ţesuturi, generând un teren favorabil pentru invazie.

Exotoxina S este produsă de tulpinile care produc infecţii pulmonare şi are un potenţial toxic inferior faţă de exotoxina A.

Proteazele (elastaza, colagenaza) au efecte toxice minime, dar produc leziuni tisulare.

Hemolizina este fosfolipaza C.

Proteaza, elastaza, hemolizina, exotoxina A alterează ţesuturile gazdei, distrug proteinele complementului, imunoglobulinele şi fribronectina (proteina care protejează celulele epiteliale de bacteriile care tind să adere). În plămân, fosfolipaza C atacă pelicula de surfactant (acoperă endoteliul alveolar şi inhibă transudarea fluidelor capilare). Acţiunea conjugată a toxinelor şi enzimelor duc la necroza tisulară şi facilitează invazia bacteriană.



**Situsul fosfolipazei C.

Patologie

Infecţiile apar la pacienţii spitalizaţi timp îndelungat, mai ales la cei imunodeprimaţi şi, în general, după mai multe cure de antibiotice. Poarta de intrare este diferită, dar în două treimi din cazuri este reprezentat de:

- translocaţia digestivă la bolnavii cu aplazie medulară;
- focare de infecţie digestive;
- dispozitive intravasculare sau urinare;
- leziuni tegumentare sau ale mucoaselor (arsuri, răni, plăgi chirurgicale).

Infecţiile respiratorii sunt produse de *Ps. aeruginosa* aproape în exclusivitate la indivizii cu leziuni ale epiteliului tractului respirator inferior (care apar în bolile cronice pulmonare şi în insuficienţa cardiacă congestivă) sau la pacienţii imunocompromişi (neutropenii, chimioterapie).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecția tractului respirator inferior la bolnavii cu fibroză chistică de către tulpinile mucoide de *Ps. aeruginosa* este greu sau chiar imposibil de tratat.

Fibroza chistică (FC) este o boală a transportului anormal al electroliților și a secreției mucoase a glandelor exocrine și a epiteliilor secretoare. Fibroza chistică se caracterizează prin triada: boală cronică pulmonară cu tuse persistentă; transpirație crescută bogată în electroliți; insuficiență pancreatică, ce duce la malabsorbție și diaree recurentă. Creșterea concentrației de sare a transpirației este un criteriu de diagnostic al FC. Electroliții din transpirație sunt Na^+, Cl^-, Ca^{2+}. Pe măsură ce fluidul secretat de glandele sudoripare trece în ductul glandei, în mod normal NaCl este absorbit și transpirația secretată este hipotonică. La pacienții cu FC, ductul glandei este mai puțin permeabil pentru Cl^- și NaCl nu se absoarbe. Secrețiile mucoase ale pacienților cu FC, inclusiv secreția traheobronșică, sunt vâscoase și deficitare în apă și electroliți, cu proprietăți reologice modificate. Glicoproteinele au componenta glucidică modificată și formează complexe insolubile cu Ca^{2+}. Vâscozitatea crescută a secreției mărește incidența infecției cu *Ps. aeruginosa, S. aureus* și *H. influenzae*. Infecția cu *S. aureus* este cea mai frecventă, dar este controlată cu antibiotice. *H. influenzae* perturbă funcția cililor și favorizează infecția cu *Ps. aeruginosa*. Tulpinile de *Pseudomonas* sunt rezistente la majoritatea antibioticelor și treptat devin dominante în microbiota pulmonară a pacienților cu FC. Tulpinile de *Ps. aeruginosa* izolate inițial de la pacienții cu FC sunt nemucoide, dar ulterior se comută la varianta mucoidă, producătoare de alginat, odată cu progresia procesului infecțios. La pacienții cu FC, predomină net (în proporție de 90%) infecția cu tulpini mucoide. Severitatea infecției pulmonare se corelează direct cu prezența tulpinilor mucoide.

Ps. aeruginosa mucoid nu produce septicemie, spre deosebire de celelalte tipuri de infecții cu tulpini nemucoide.

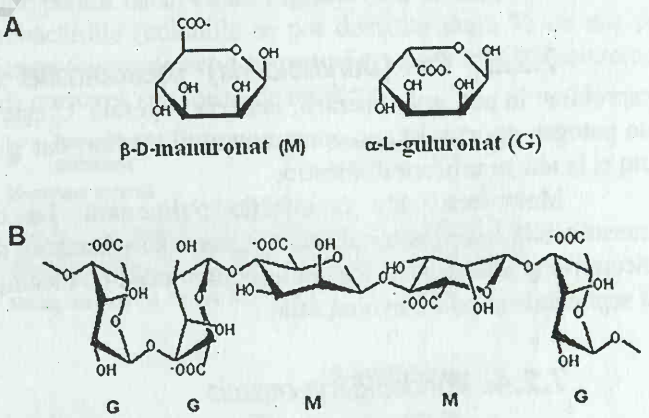
Sinteza alginatului conferă câteva avantaje pentru rezistența *Ps. aeruginosa* în țesutul pulmonar:

- stratul de alginat împiedică legarea anticorpilor la determinanții antigenici ai suprafeței celulei, care ar condiționa fagocitoza opsonică. Tulpinile mucoide sunt mai rezistente la fagocitoza non-opsonică;
- alginatul este o barieră mecanică pentru antibioticele aminiglicozidice;
- alginatul mărește gradul de aderență al tulpinilor mucoide de celulele epiteliale ale tractului pulmonar, inhibând activitatea mecanismelor de *clearing* pulmonar;
- alginatul nu inhibă sinteza anticorpilor specifici, dar pare să inhibe IMC.

Alginatul este un copolimer linear de acid D-manuronic și acid guluronic. Resturile de maluronat pot fi modificate cu grupări O-acetil, ceea ce îl deosebește de alginatul produs de alge.

LPS de *Ps. aeruginosa* are o toxicitate scăzută și nu are rol în patogenitatea infecției la pacienții cu FC.

Ps. aeruginosa provoacă *bacteriemii* în primul rând la pacienții imunocompromiși. Factorii predispozanți includ malignitatea hematologică, imunodeficiența datorată SIDA, neutropenia, *diabetus mellitus* și arsurile severe. Majoritatea bacteriemiilor produse de *Pseudomonas* sunt infecții nosocomiale (25% din totalul bacteriemiilor dobândite în spitale).



Structura moleculară a alginatului (www.aapspharmscitech.org/articles).

Ps. aeruginosa produce meningite și abcese cerebrale, prin contaminare de la nivelul urechii interne și sinusurilor paranazale, sau prin inocularea directă consecutivă traumelor craniene, intervențiilor chirurgicale, folosirii metodelor invazive de diagnostic sau prin extinderea procesului infecțios de la un situs îndepărtat, cum ar fi tractul urinar.

Ps. aeruginosa este agentul etiologic predominant în unele cazuri de otite externe incluzând "otita înotătorului". Bacteria este rar întâlnită în mod normal în ureche, dar populează adeseori canalul auditiv extern după rănire, inflamație sau în condiții de umiditate crescută. La diabetici produce otita invazivă.

Ps. aeruginosa poate cauza infecții devastatoare ale ochiului, fiind una dintre cele mai comune cauze ale keratinei bacteriene. Bacteria a fost izolată și identificată ca agent etiologic al *oftalmiei neonatale*. *Pseudomonas* poate coloniza epiteliul ocular prin atașarea fimbriilor la receptorii reprezentați de *acidul sialic*. Dacă sistemul de apărare este compromis, bacteria poate prolifera rapid și prin secreția enzimelor (elastaza, proteaza alcalină și exotoxina A) produce o infecție rapidă și distructivă care poate duce la pierderea întregului ochi.

Infecțiile oaselor și articulațiilor cu *Pseudomonas* sunt rezultatul inoculării directe a bacteriei sau prin diseminarea din alte situsuri de infecție. Infecțiile cu origine sanguină sunt mai des întâlnite la consumatorii de droguri intravenoase, la cei cu infecții ale tractului urinar sau cu infecții pelvice. *Ps. aeruginosa* are un tropism particular pentru articulațiile fibrocartilaginoase ale scheletului axial și produce osteomielite cronice, de obicei datorate inoculării directe a osului. Este cel mai comun patogen implicat în *osteocondritele* consecutive rănirii prin înțepare la nivelul membrelor inferioare.

Infecțiile tractului urinar cauzate de *Ps. aeruginosa* sunt de obicei dobândite în spital (12% din infecțiile urinare nosocomiale) și sunt datorate cateterizării tractului urinar, utilizării instrumentarului infectat sau intervențiilor chirurgicale. *Pseudomonas* se numără printre cei mai aderenți dintre patogenii epiteliului vezicii urinare, iar infecția poate avea loc pe cale ascendentă sau descendentă. Dar *Pseudomonas* poate invada torentul sanguin de la nivelul tractului urinar, aceasta fiind sursa a 40% din totalul bacteriemiilor provocate de *Pseudomonas*.

Ps. aeruginosa poate produce leziuni la indivizii imunocompromiși la nivelul oricărui segment al tractului gastrointestinal de la orofaringe la rect, fiind implicat în etiologia infecțiilor perirectale, diareii la copii, gastroenteritelor tipice și enterocolitelor necrozante.

Ps. aeruginosa poate cauza o varietate de infecții ale pielii, atât localizate, cât și difuze. Factorii predispozanți comuni sunt colapsul tegumentului datorat arsurilor, traumelor sau dermatitelor; condiții de umiditate ridicată (urechea înotătorilor și zonele periungulare ale degetelor atleților și militarilor, regiunea perineală la copii), neutropenie și SIDA. *Pseudomonas* a fost de asemenea, implicat în etiologia foliculitelor și formelor de *acneea vulgaris*.

Ps. aeruginosa produce *endocardita* după ce colonizează endocardul, în special la consumatorii de droguri, ca și valvele cardiace artificiale, după invazia pe cale sanguină.

7.2.2. *Ps. mallei* produce, la cal, o boală cunoscută sub denumirea de *răpciugă*. Este un parazit adevărat și nu poate supraviețui în mediul extern. Focarul primar al infecției este plămânul. Infecția se poate transmite la om.

7.2.3. *Ps. (Burkholderia) pseudomallei* este un bacil aerob Gram negativ, imobil, saprobiont în sol, apă, orezării, materia vegetală. Crește la 42°C, oxidează glucoza, lactoza etc. și este un patogen oportunist, un contaminant al rănilor, dar și agentul *meloidozei*, o boală tropicală fatală la om și la alte mamifere domestice.

Meloidoza este o infecție pulmonară. La cabaline *Ps. pseudomallei* produce morva, transmisibilă la om. La cal, infecția implică plămânul, dar evoluează sistemic, cu leziuni subcutanate ulcerative și adenopatie. La om infecția începe cu ulcerații tegumentare sau ale mucoaselor, adenopatie și septicemie și poate evolua fatal.

7.2.4. *Burkholderia cepacia*

Complexul *Burckholderia caepacia* (Bcc) cuprinde 9 specii cu distribuție ubiquitară, cu efecte atât benefice, cât și detrimentale asupra plantelor și mediului (fig. 175), putând fi izolate din ape, sol, plante, animale și materie organică în descompunere, rețelele de apă potabilă, mediile umede spitalicești (Mahenthiralingam și colab., 2005). Patogenul prezintă interes pentru pacienții cu fibroză chistică, care pot fi purtători asimptomatici, sau infecția poate evolua cu deteriorarea progresivă a țesutului pulmonar, în câteva luni sau foarte rapid, cu apariția pneumoniei necrozante și a bacteriemiei. A fost demonstrată transmiterea bacteriei între pacienții cu fibroză chistică. Virulența este multifactorială, implicând aderența la celulele epiteliale ale gazdei și la mucină prin intermediul

pililor, producerea de proteaze, hemolizine, LPS cu toxicitate ridicată şi cu o structură unică care îi conferă rezistenţă la fagocitoză, elaborarea de melanină care protejează celulele bacteriene de sistemele microbicide dependente de oxigen şi potenţialul parazitism intracelular recent demonstrat la această specie, ca şi la *B. pseudomallei* (Speert, 2001). S-a demonstrat că infecţia cu *Ps.aeruginosa* favorizează colonizarea ulterioară cu *Burckholderia caepacia.*

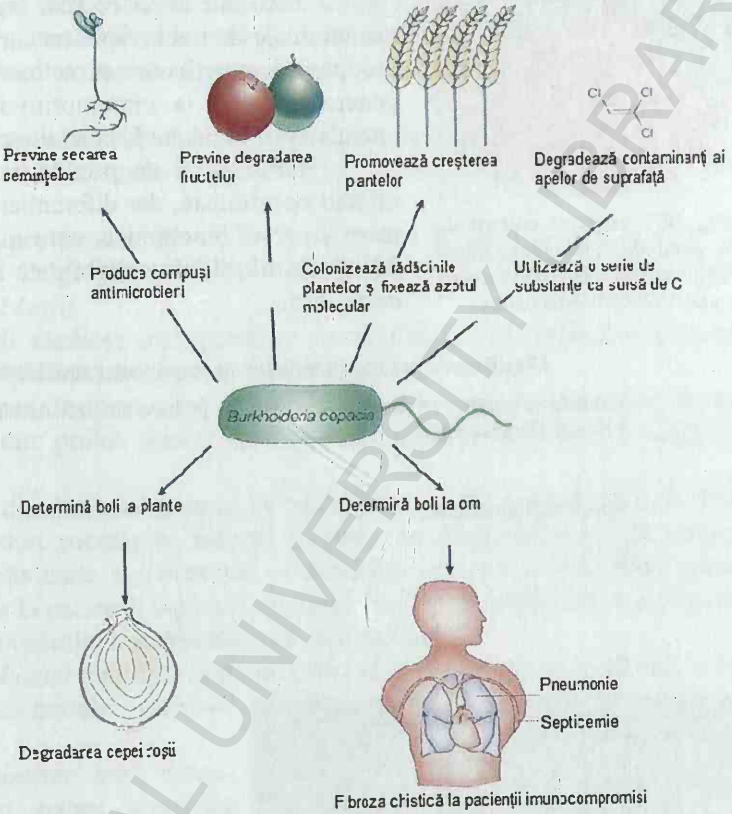


Fig. 175. Efectele benefice şi negative ale speciei *Burkholderia cepacia* (http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/images/nrmicro1085-f1.gif).

B. cepacia se dezvoltă pe medii obişnuite pentru bacili Gram negativi (sau pe medii selective cu colistin), dar au creştere mai lentă decât enterobacteriile (coloniile se pot dezvolta după 72 de ore de incubare). Prezintă rezistenţă multiplă la antibiotice (cloramfenicol, trimetoprim, quinolone, β-lactamice, aminoglicozide, colistin) (fig. 176), amplificată de creşterea sub formă de biofilme.

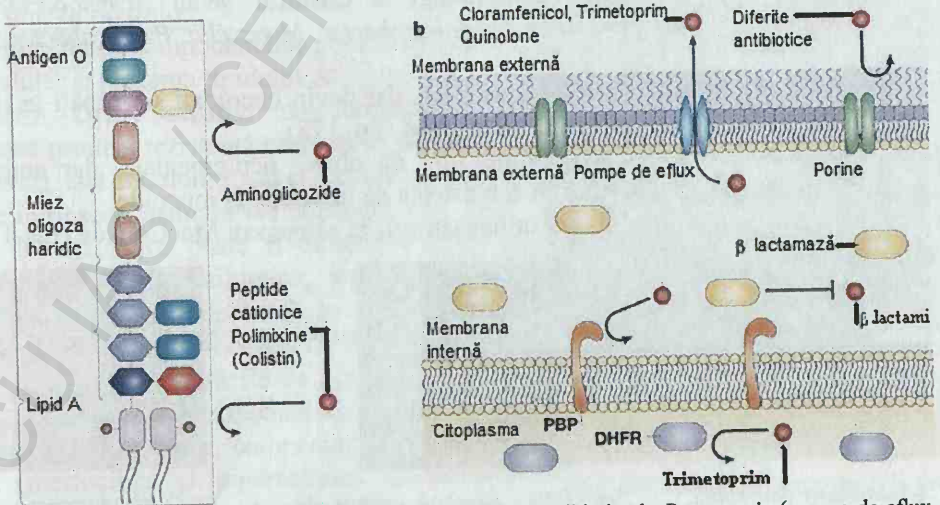


Fig. 176. Reprezentarea schematică a mecanismelor de rezistenţă la antibiotice la *B. caepacia* (pompe de eflux, β-lactamaze, DHF-reductaze, impermeabilitate pentru antibioticele peptidice, imposibilitatea de legare a aminoglicozidelor la LPS) www.nature.com/.../n2/images/nrmicro1085-f3.gif.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.2.5. *Stenotrophomonas maltophilia*

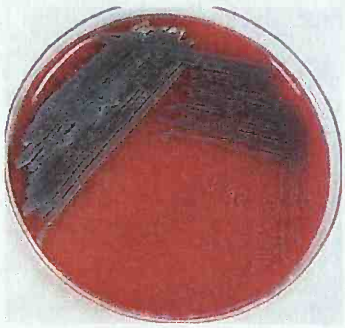


Fig. 177. Aspectul culturii de *St. maltophilia* pe geloză sânge (http://amanwithaphd.files.wordpress.com/2008/05/steno.jpg).

St. maltophilia este o specie ubiquitară care formează pe medii de cultură colonii verde-lavandă sau gri (fig. 177), este oxidazo-negativă şi lizin-decarboxilază pozitivă.

Este din ce în ce mai frecvent raportat ca agent al infecţiilor nosocomiale de tract respirator, urinar, ale plăgilor sau al bacteriemiilor asociate dispozitivelor protetice (Brooks şi colab., 2007). Este în general sensibil la trimetoprim-sulfametoxazol şi ticarcilină cu acid clavulanic şi rezistent la celelalte clase de antibiotice.

Alte specii de pseudomonade (tabelul 20) pot fi izolate din infecţii oportuniste, dar diferenţierea lor necesită realizarea unui număr mare de teste biochimice, care nu pot fi efectuate în laboratoarele de rutină. Profilurile de sensibilitate la antibiotice sunt diferite faţă de *Ps. aeruginosa.*

Tabelul 20.

Clasificarea pseudomonadelor de importanţă medicală (Gilligan et al., 2003).

Grupuri şi subgrupuri de omologie stabilite pe baza analizei ARNr	Genuri şi specii
I Specii fluorescente	*Ps. aeruginosa*
	Ps. fluorescens
	Ps. putida
Specii nefluorescente	*Ps. stutzeri*
	Ps. mendocina
II	*Burkholderia pseudomallei*
	B. mallei
	B. cepacia
	Ralstonia pickettii
III	*Comamonas* sp.
	Acidovorax sp.
IV	*Brevundimonas* sp.
V	*St. maltophilia*

7.2.6. Genul *Acinetobacter* cuprinde bacterii Gram negative nefermentative, saprobionte în sol, apă, apă menajeră şi hrană, comensale ale tegumentului personalului medical şi pacienţilor, dar sunt de asemenea patogeni nosocomiali importanţi, mai ales în unităţile de terapie intensivă.

Datorită versatilităţii lor metabolice pot avea rol important într-o varietate de procese industriale, cât şi în biodegradarea unor poluanţi ai mediului.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology a clasificat genul *Acinetobacter* în familia *Moraxellaceae* (Rossau et all, 1991), care include: *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter* şi organisme înrudite.

Sunt bacili Gram negativi în fază logaritmică, dar devin cocoidali şi grupaţi în diplo- sau în lanţuri de lungimi variabile în fază staţionară de creştere (fig. 178).

Multe tulpini sunt capsulate. Coloniile sunt de obicei nepigmentate, dar anumite tulpini formează colonii albe sau crem, ce variază în consistenţă de la netede la mucoide.

Pentru izolatele din mediul clinic se utilizează geloza sânge sau MacConkey (fig. 179A, B).

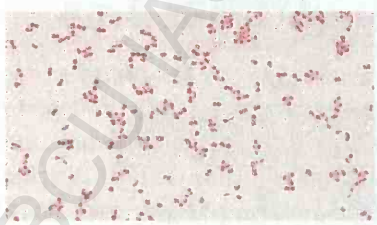


Fig. 178. Acinetobacter baumannii. Cocobacili Gram negativi.

Fig. 179A. Aspectul culturii de *Acinetobacter baumanii* pe mediu MacConkey (colonii lactozo-pozitive)

Fig. 179B. Aspectul culturii de *Acinetobacter baumanii* pe geloză sânge (http://microblog.me.uk/wp-content/uploads/a_baum_02.jpg).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Toți membrii genului *Acinetobacter* sunt strict aerobi și pot crește la 33°C, unele tulpini preferă temperaturi de 30–42°C, iar cele izolate din mediu 20–30°. Toate tulpinile de *Acinetobacter* sunt oxidazo-negative și catalazo-pozitive. Reacția oxidazei diferențiază tulpinile de *Acinetobacter* de alte genuri înrudite. Toate tulpinile de *Acinetobacter* sunt oxidazo negative deoarece nu au citocrom C, dar au citocrom b și ocazional citocrom d și P_{450}.

Majoritatea tulpinilor cresc pe medii minerale simple. Unele tulpini pot utiliza glucoza și pot produce hemoliza pe geloză sânge datorată fosfolipazei C. Majoritatea tulpinilor sunt rezistente la penicilină, iar unele izolate clinice sunt rezistente de asemenea la cefalosporine prin supraproducerea unei cefalosporinaze cromosomale.

Speciile genului *Acinetobacter* contaminează pacienții și personalul medical putând fi izolate dintr-o mare varietate de surse: praf, echipamente de ventilație, bazine de spălat, alimente, ploști, textile, mobilier.

Tulpinile de *Acinetobacter* pot persista în mediu mai multe zile până la câteva săptămâni, chiar în condiții de desicație. Pe lângă *Acinetobacter baumannii* s-au izolat și alte specii de *Acinetobacter*, ca *A. johnsonii* și *A. lwoffii*.

Cel puțin 25% din indivizii sănătoși sunt purtători de tulpini de *Acinetobacter* ca parte a microbiotei normale a tegumentului (Schreckenberger și colab., 2003).

Frecvența infecțiilor nosocomiale cauzate de *Acinetobacter* este greu de determinat deoarece izolarea acestor microorganisme din probe clinice nu reflectă neapărat infecția, ci colonizarea (Schreckenberger și colab., 2003).

Acinetobacter a fost izolat din mai multe tipuri de infecții oportuniste (septicemie, 3–5% din pneumoniile nosocomiale, endocardite, meningite, infecții cutanate, de plagă chirurgicală, oculare și de tract urinar). La persoanele spitalizate s-a observat o incidență crescută a infecțiilor tractului respirator cu *Acinetobacter* mai ales la pacienții ventilați mecanic din terapie intensivă. Acești pacienți sunt adesea contaminați/colonizați la nivelul tegumentului cu *Acinetobacter*.

Izolatele clinice de *Acinetobacter* sunt frecvent rezistente la majoritatea antibioticelor utilizate pentru tratamentul infecțiilor nosocomiale (inclusiv carbapenemi).

Deși speciile de *Acinetobacter* sunt considerate a avea potențial patogen redus, virulența tulpinilor implicate în diferite infecții este conferită de;
1) prezența capsulei polizaharidice formată din L ramnoză, D glucoză, acid D glucuronic, D manoză;
2) aderența la celulele epiteliale mediată de fimbrii și/sau polizaharide capsulare;
3) sinteza lipazelor;
4) toxicitatea componentelor polizaharidice ale peretelui celular și prezența lipidului A.

Bacilii Gram negativi non-fermentativi se caracterizează printr-o rezistență crescută la substanțele antimicrobiene, atât antibiotice, cât și dezinfectanți, prin mecanisme intrinsece, naturale sau dobândite (fig. 180). Rezistența la antibiotice poate fi dobândită chiar în cursul tratamentului cu antibiotice, fapt ce necesită testarea tulpinilor izolate succesiv de la același pacient. În cazul tulpinilor izolate din cazuri de fibroză chistică, timpul de incubare trebuie să fie de minim 24 de ore. Bacilii Gram negativi non-fermentativi sunt sensibili la carboxipeniciline (ticarcilina, carbpenicilina) și ureidopeniciline (mezlocilina și piperacilina). La pseudomonade, testul rapid pentru evidențierea β-lactamazelor nu se recomandă, datorită multiplelor mecanisme de rezistență la aceste antibiotice (CLSI, 2009).

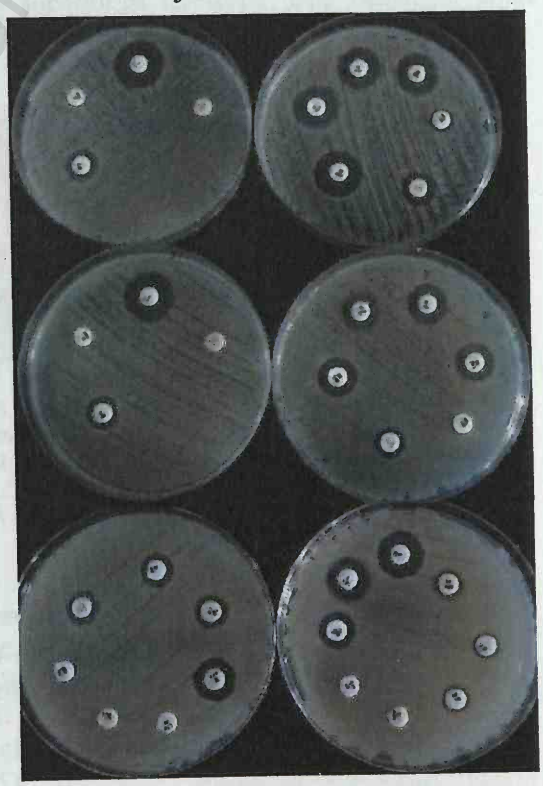


Fig. 180. Fenotipuri de rezistență la antibiotice ale unor tulpini de *A. baumanii* (sensibile exclusiv la colistin), izolate din secreții traheale ale pacienților spitalizați.

7.2.7. Alte specii de bacili Gram negativi

Genul *Actinobacillus*

A. actinomycetemcomitans este un cocobacil Gram negativ (fig. 181, 182) cu creştere lentă, adesea asociat cu actinomicozele. Este agentul etiologic al infecţiei periodontale la adolescenţi, a endocarditelor, abceselor, osteomielitei şi al altor infecţii (Steinberg şi Del Rio, 2005). Este sensibil la tetraciclină, cloramfenicol, penicilină G, ampicilină şi eritromicină.

Fig. 181. A. actinomycetemcomitans – aspectul microscopic, pe frotiu colorat Gram (http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/03272002/00006/PHIL_1937_lores.jpg).

Fig. 182. Aspectul culturii de *A. actinomycetemecomitans* pe geloză sânge (www.blackholm.com/parodontitis/kulturschale.jpg).

Genurile *Achromobacter* şi *Alcaligenes*

Sunt bacili Gram negativi (fig. 183–185), oxidază-pozitivi, cu mobilitate de tip peritrih spre deosebire de pseudomonade, care prezintă mobilitate de tip polar. Utilizează citratul ca sursă de C, produc uree şi degradează glucoza în aerobioză şi anaerobioză (Steinberg şi Del Rio, 2005). Au fost izolaţi din microbiota normală, echipamente de ventilaţie şi sisteme de dializă, iar ocazional din sânge, urină, LCR, plăgi, abcese.

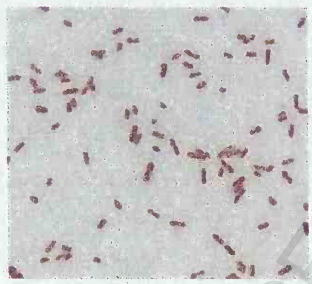


Fig. 183. Alcaligenes faecalis Bacili pe frotiul colorat Gram (http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/ccImages/Articleimages/Atlas-Gram/Alcaligenes%20faecalis%20fig2.jpg).

Fig. 184. Aspectul culturii de *Alcaligenes faecalis* pe geloză sânge (lookfordiagnosis.com).

Fig. 185. Aspectul culturii de *Achromobacter* pe geloză simplă (www.flickr.com/photos/synonyme_c/3883406432/).

Genul *Ochrobactrum*

Genul *Ochrobactrum* include specii asemănătoare cu *Achromobacter* şi *Alcaligenes*. *Ochrobactrum anthropi* este adesea izolată din bacteriemii asociate dispozitivelor intravasculare şi poate contamina, de asemenea produsele biologice (Steinberg şi Del Rio, 2005).

Genul *Capnocytophaga*

Capnocytophaga cuprinde specii cu creştere lentă, capnofile, Gram negative, fusiforme sau filamentoase (fig. 186), facultativ anaerobe, care necesită CO_2 pentru creştere (fig. 186). Prezintă mobilitate prin alunecare, care se reflectă în extinderea treptată a coloniilor pe medii de cultură (fig. 186–188).

BCU "IULIU HAŢIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 186. Polimorfismul celulelor de *Capnocytophaga* pe frotiul colorat Gram (www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v24n1/fig09-04.jpg).

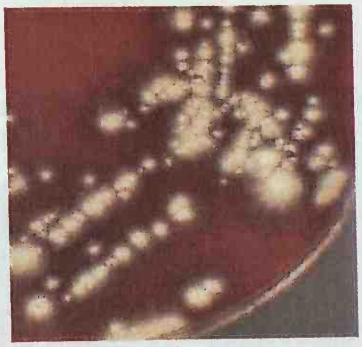


Fig. 187. Morfologia coloniilor de *Capnocytophaga* pe geloză sânge (www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v24n1/fig09-04.jpg).

Fig. 188. Cultura de *Capnocytophaga* pe geloză sânge, cu evidențierea hemolizei (www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v24n1/fig09-04.jpg).

Unele tulpini de *Capnocytophaga* produc o substanță care modifică activitatea PMNN. Speciile de *C. ochracea, C. sputigena* și *C. gingivalis* sunt rezidente ale microbiotei normale. Ocazional, pot determina bacteriemii și infecții sistemice cu evoluție gravă, în special la pacienții imunodeprimați (mai ales neutropenici sau pacienți cu ulcerații ale mucoasei cavității bucale). *C. canimorsus* (anterior DF-2-*dysgonic fermenter* 2) constituent al microbiotei normale la câine, poate produce infecții fulminate la pacienții asplenici și alcoolici. *C. cynodegmi* (DF-2-*like*) poate produce infecții consecutive mușcăturii sau zgârieturii de câine și pisică (Steinberg și Del Rio, 2005).

Genul *Cardiobacterium*

Cardiobacterium hominis este un bacil Gram negativ pleomorf (fig. 189, 190), facultativ anaerob, constituent al microbiotei tractului respirator superior și intestinal, care ocazional poate determina endocardita (Steinberg și Del Rio, 2005).

Fig. 189. Aspectul microscopic al frotiului colorat Gram din cultură de *C. hominis*. Bacili Gram negativi, grupați în stea sau rozetă (www.john-libbey-eurotext.fr/en/revues/medecine/bdc/e-docs/).

Fig. 190. Aspectul culturii de *Cardiobacterium hominis* pe geloză sânge (http://3.bp.blogspot.com/_5s6uG0AE5v4/SxO55b8EFsI/AAAAAAAAAns/ZCJoZ0uwcSw/s1600/cardiohom.jpg).

Genul *Chromobacterium*

Ch. violaceum este un bacil Gram negativ asemănător cu pseudomonadele, care ocazional poate produce un pigment violet (fig. 191). În zonele subtropicale poate produce abcese, diaree, infecții septice, în urma contaminării pe cale intestinală sau prin țesutul cutanat lezat. Chromobacteriile sunt sensibile la cloramfenicol, tetracicline și aminoglicozide (Steinberg și Del Rio, 2005).

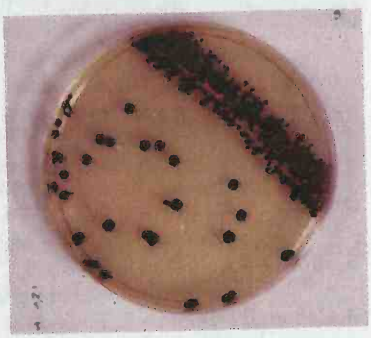


Fig. 191. Colonii violacee de *Chromobacterium* pe agar Muller Hinton (http://www.scielo.br/img/fbpe/rimtsp/v42n2/n2a08fg1.gif).

Eikenella corrodens

E. corrodens este un bacil Gram negativ, de dimensiuni mici (fig. 192), cu exigenţe nutritive, oxidază-pozitiv, capnofil, nu fermentează zaharurile, constituent al microbiotei cavităţii orale şi intestinale la 40–70% dintre indivizi. 50% dintre tulpini formează colonii intruzate în agar (fig. 193).

Fig. 192. E. corrodens pe frotiul colorat Gram (http://content8.eol.org/content/2009/11/25/03/31427_large.jpg).

Fig. 193. Colonii de *Eikenella* pe geloză sânge (www.buddycom.com/bacteria/gnr/cardiohomth.gif).

Fig. 194. Colonii de *Cryseobacterium* pigmentate galben (http://www.carlosdavey.com/files/mars_microbes_200.jpg).

Este adesea asociat cu streptococii în infecţiile mixte cu contaminare orală. Tulpinile de *Eikenella* sunt constitutiv rezistente la clindamicină şi sensibilă la peniciline şi cefalosporine (Steinberg şi Del Rio, 2005).

Genul *Chryseobacterium*

Sunt bacili Gram negativi, lungi, fini, oxidazo-pozitivi, imobili, proteolitici şi slab fermentativi, care formează colonii pigmentate galben, specific (fig. 194). *Chryseobacterium* este adesea izolat din puroaie superficiale, conducte şi echipamente medicale expuse la o sursă de apă contaminată şi nesterilizate. Ocazional poate coloniza tractul respirator superior şi rareori este cauza meningitei (specia *Chryseobacterium meningosepticum*). Speciile acestui gen sunt în general multirezistente la antibiotice (Steinberg şi Del Rio, 2005).

Genul *Kingella*

Grupul *Kingella* include 3 specii, de importanţă medicală fiind *K. kingae*. Sunt bacili Gram negativi, cu forme cocobacilare sau diplococi (fig. 195), hemolitici pe geloză sânge.

Intră în componenţa microbiotei orale şi poate genera ocazional infecţii osoase, articulare şi ale tendoanelor, probabil după diseminarea în sânge prin microhemoragiile consecutive periajului dentar. Este sensibilă la penicilină, ampicilină, eritromicină şi la alte antibiotice (Steinberg şi Del Rio, 2005).

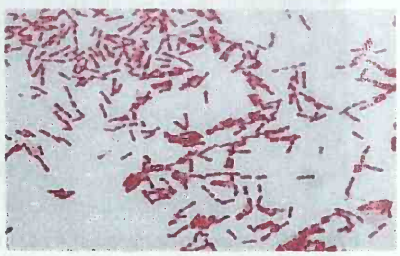


Fig. 195. Kingella kingae pe frotiul colorat Gram (http://www.nature.com/eye/journal/v20/n9/images/6702119f2.jpg).

Bibliografie

1. May T. B., Shinabarger D., Maharaj R., Kato J., Chu L., DeVault J. D., Roychoudhury S., Zielinski N. A., Berry A., Rothmel R. K .1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin. Microbiol. Reviews. 4: 191–206.
2. Govan J. R., Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* – Microbiol. Rev. 60(3): 539–574.
3. Brooks G. F., Caroll K.C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition Jawetz, Melnick şi Adelberg. http:// www.accessmedicine.com
4. Coburn B., Sekirov I., Finlay B.B. 2007.Type III Secretion Systems and Diseas. Clin. Micr. Reviews. 20 (4): 535–549.

5. http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/123-4.jpg
6. www.aapspharmscitech.org/articles
7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/:1
8. http://microblog.me.uk/wp-content/uploads/a_baum_02.jpg
9. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n12/images/nrmicro1789-f2.jpg
10. Gilligan P. H. et al. 2003. *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, Pandoreae* and *Acidovorax*. In: *Manual of Clinical Microbiology,* 8th ed. Murray PR et al (editors). ASM Press.
11. Kiska D. L., Gilligan P. H. 2003. *Pseudomonas*. In: *Manual of Clinical Microbiology,* 8th ed. Murray PR et al (editors). ASM Press.
12. Schreckenberger PC et al. 2003. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella,* and other nonfermentative Gram negative rods. In: *Manual of Clinical Microbiology,* 8th ed. Murray PR et al (editors). ASM Press.
13. Steinberg J. P., Del Rio C. 2005. Other Gram negative and gram-variable bacilli. In: *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases,* 6th ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Churchill Livingstone
14. Mahenthiralingam E., Teresa A. Goldberg U., Goldberg J. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. Nature Reviews Microbiology. 3: 144–156
15. www.nature.com/.../n2/images/nrmicro1085-f3.gif
16. Speert DP. Understanding *Burkholderia cepacia*: Epidemiology, Genomovars, and...: Virulence. 2010. MedscapeCME, September 1, medscape.com
17. Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1.
18. http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/03272002/00006/PHIL_1937_lores.jpg)
19. www.blackholm.com/parodontitis/kulturschale.jpg)
20. www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v24n1/fig09-04.jpg
21. www.buddycom.com/bacteria/gnr/cardiohomth.gif
22. http://amanwithaphd.files.wordpress.com/2008/05/steno.jpg
23. http://3.bp.blogspot.com/_5s6uG0AE5v4/SxO55b8EFsI/AAAAAAAAAns/ZCJoZ0uwcSw/s1600/cardiohom.jpg
24. http://content8.eol.org/content/2009/11/25/03/31427_large.jpg
25. http://www.carlosdavey.com/files/mars_microbes_200.jpg
26. http://www.nature.com/eye/journal/v20/n9/images/6702119f2.jpg
27. www. lookfordiagnosis.com
28. http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/ccImages/Articleimages/Atlas-Gram/Alcaligenes%20faecalis%20fig2.jpg)
29. www.flickr.com/photos/synonyme_c/3883406432
30. www.aapspharmscitech.org/articles

7.3. Familia Pasteurellaceae

7.3.1. Genul *Pasteurella*

Speciile de *Pasteurella* sunt patogene în primul rând pentru animale, dar pot produce infecții variate şi la om. Sunt cocobacili Gram negativi (fig. 196–198), imobili, aerobi, facultativ anaerobi, cu aspect bipolar pe frotiurile colorate, pozitivi pentru testele catalazei şi oxidazei.

Fig. 196. Cultura de *P. multocida* pe geloză sânge (colonii nehemolitice, cu miros caracteristic) (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/).

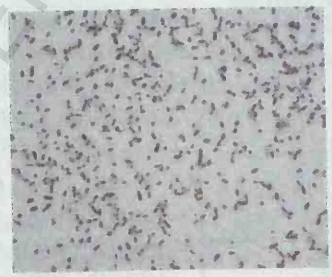


Fig. 197. P. multocida. Cocobacili sau bacili Gram negativi) (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/).

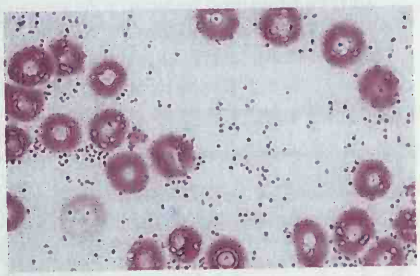


Fig. 198. P. multocida pe frotiu colorat Giemsa din hemocultură (se observă formele cocobacilare) (http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/phototheque/Pasteurella_multocida_Hemoc.jpg).

P. multocida populează tractul respirator şi gastrointestinal al animalelor domestice şi sălbatice. Infectează rănile tegumentare umane, după contactul cu animalele de casă (câine, pisică). La păsări, cal, ovine, porc produce septicemia hemoragică.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.3.2. Genul *Haemophilus*

g. *Haemophilus* aparţine familiei *Pasteurellaceae* şi reuneşte un grup de bacterii Gram negative, pleomorfe (în produsele patologice - LCR, expectoraţii- sunt prezenţi cocobacili Gram negativi până la forme alungite), ce cresc pe medii îmbogăţite cu sânge parţial degradat (geloză chocolat), de unde şi denumirea actuală, de *Haemophilus influenzae*. Genul *Haemophilus* a fost descoperit de Pfeiffer în 1890 în expectoraţia bolnavilor de gripă, crezându-se iniţial că această bacterie este agentul etiologic al gripei, fiind numit *Bacillus influenzae*. Ulterior, s-a demonstrat că *Haemophilus* este bacteria care determină complicaţiile bacteriene la bolnavii de gripă.

H. influenzae este un agent patogen important pentru om, care infectează mucoasa tractului respirator superior la copii şi adulţi şi produce infecţii meningeale şi ale tractului respirator, în special la copii. Colonizarea cu tulpini capsulate creşte riscul apariţiei manifestărilor patologice. Poate de asemenea coloniza mucoasa vaginală, fiind o sursă posibilă de contaminare şi de infecţii genitale şi neonatale cu posibilă evoluţie septicemică. Este responsabil mai ales de infecţiile comunitare în sfera ORL la adult şi copil şi în suprainfecţiile bronhopulmonare la adult (dar şi la copii, în cazul existenţei unor factori de risc cum ar fi mucoviscidoza sau bronhodilataţia). Aceste infecţii sunt provocate de tulpini necapsulate. Alterarea şi modificarea mucoaselor din bronşitele cronice poate de asemenea favoriza colonizarea şi multiplicarea bacteriilor. Manifestările invazive sunt reprezentate mai ales de meningite (cauza cea mai frecventă la copiii sub 5 ani nevaccinaţi), epiglotite, pneumonii, artrite, pericardite, celulite.

Infecţiile localizate apar după scăderea eficienţei mecanismelor de apărare locală (în special disfuncţia sistemului mucociliar după sau în cursul unei infecţii virale sau la fumători). Posedă adezine şi IgA-proteaze care favorizează colonizarea şi infecţia, deşi rolul acestor factori în virulenţă nu a fost pe deplin stabilit.

În cursul manifestărilor invazive, capsula joacă un rol determinant, conferind protecţia faţă de fagocite şi faţă de acţiunea litică a complementului.

Starea septicemică se instalează după colonizarea iniţială a mucoasei, translocaţia prin mucoasă şi multiplicarea în ţesutul conjunctiv, urmată de diseminarea în vasele mici de sânge. Bacteria se poate multiplica în sânge, fiind protejată de capsula polizaharidică, faţă de multiplele sisteme bactericide din ser.

Identificarea speciilor de *Haemophilus* se bazează pe demonstrarea necesităţii factorilor de creştere X şi V (Tabelul 21). Factorul X este hemina, iar factorul V poate fi reprezentat de NAD sau de alte enzime.

Tabelul 21.

Distribuţia speciilor de *Haemophilus* importante în patologia umană în funcţie de necesităţile nutritive pentru factori de creştere (X = Hem; V = Nicotinamid-Adenin Dinucleotid) şi proprietăţile hemolitice (după Brooks şi colab., 2007).

	Necesită		Hemoliza
Specii	**X**	**V**	
H. influenzae (H aegyptius)	+	+	–
H. parainfluenzae	–	+	–
H. ducreyi	+	–	–
H. haemolyticus	+	+	+
H. parahaemolyticus	–	+	+
H. aphrophilus	–	–	–
H. paraphrophilus	–	+	–
H. paraphrophaemolyticus	–	+	+
H. segnis	–	+	–

Suprafaţa celulelor bacteriene patogene expune molecule glucidice, lipidice, accesibile recunoaşterii sistemului imunitar. Factorii majori ai virulenţei la *H. influenzae* sunt LPS şi polizaharidul capsular. Capacitatea de a produce infecţii (de a coloniza ţesuturile gazdei) este asociată în mod absolut, cu sinteza *polizaharidului capsular*. Faptul se explică prin proprietăţile chimiotactic negative ale polizaharidului capsular pentru fagocite. Polizaharidul capsular şi LPS inhibă acţiunea fagocitelor şi protejează celula de posibila liză mediată de proteinele activate ale complementului. Datorită structurii capsulare, complementul se activează la distanţă de membrana externă.

Polizaharidul capsular prezintă o accentuată *variaţie chimică*. Pe baza diferenţelor chimice ale polizaharidului capsular, tulpinile capsulate sunt împărţite în 6 grupe serologice (a–f). Virulenţa cea mai ridicată este evidenţiată pentru serogrupul b, urmat de a, e şi f. Antigenul capsular al *H. influenzae* b este un polimer de riboză-ribitol-fosfat.

Tulpinile care nu sintetizează polizaharidul capsular sunt mai puțin virulente sau avirulente și se găsesc în microbiota normală a tractului respirator superior, dar au avantajul că nu sunt recunoscute de anticorpii specifici față de antigenul capsular. Rata portajului pentru *H. influenzae* este de până la 80%, iar pentru *H. influenzae b*, agentul meningitei, pneumoniei, artritei septice, de până la 4%.

Anticorpii față de polizaharidul capsular de tip b sunt protectori, vârsta la care apare meningita fiind între 3 luni (când dispare protecția pasivă oferită de Ac maternali) și 3 ani (când se acumulează Ac la un titru protector). Vaccinarea determină obținerea unui titru protector încă din primele luni de viață.

Variația antigenică a LPS este generată de modificări ale setului de enzime implicate în calea sintezei sale. Populațiile bacteriene care exprimă variante biochimice ale LPS rezultă din modificări ale secvenței resturilor glucidice în *regiunea centrală a oligozaharidului LPS*.

Tulpinile netipabile de *H. influenzae* (NTHi) sunt cocobacili mici Gram negativi care nu produc și nu au genele codificatoare ale capsulei polizaharidice. Ele se diferențiază pe baza următoarelor criterii:

- heterogenitatea greutății moleculare a proteinelor membranei externe (OMP) și a antigenității lor;
- heterogenitatea antigenică a lipooligozaharidelor (LOS);
- markeri moleculari (evidențiați prin tipizare electroforetică, RFLP, PCR).

Capacitatea tulpinilor netipabile de *H. influenzae* de a adera la suprafața membranelor mucoase sau la matricea extracelulară este esențială pentru colonizarea și multiplicarea în organismul gazdă. NTHi colonizează regiunea nazofaringiană la 80% dintre indivizii umani. NTHi aderă preferențial la celulele epiteliului respirator cărora le lipsesc cilii sau sunt lezate structural.

Lipooligozaharidul (LOS) apare atât în formă secretată, cât și legată de celule. LOS eliberată din NTHi pare a fi mult mai potentă în stimularea secreției de către monocite, a citokinelor activatoare ale procesului inflamator. LOS este un antigen major al suprafeței celulare și reprezintă 4% din greutatea uscată a organismului. Regiunea lipidică este asemănătoare cu aceea a bacteriilor Gram negative, dar LOS conține catene laterale oligozaharidice, mai scurte decât catenele polizaharidice ale LPS de la *Enterobacteriaceae*.

Din punct de vedere funcțional, LOS de la *H. influenzae* este asemănătoare LPS de la enterobacterii. Heterogenitatea structurii LOS favorizează evaziunea față de mecanismele răspunsului imun. LOS are efecte toxice și produce leziuni pulmonare. Forma solubilă a LOS, termostabilă, inhibă mișcarea cililor și induce răspunsul inflamator: PMN sunt recrutate rapid în spațiul pulmonar. Creșterea numărului de PMN în plămân este însoțită de inflamația generală a țesutului, cu creșterea nivelului transferinei, factorului activator al plachetelor, lactoferinei). Legarea LOS de aceste proteine diminuează răspunsul PMN la LOS. Lactoferina, prezentă în granulele PMN și în secrețiile mucoase, se leagă de componenta lipidică a LOS, efectul fiind staza bacteriană și liza. Legarea LOS de lactoferină scade capacitatea bacteriilor de a stimula PMN.

H. influenzae nu produce exotoxine. Virulența este condiționată de prezența capsulei.

Mecanismele evaziunii mecanismelor de apărare ale gazdei. Organismul uman și animal posedă o serie de mecanisme de protecție, înnăscute și dobândite, față de agenții infecțioși. Bacteriile ca NTHi au dezvoltat numeroase mecanisme prin intermediul cărora evită sistemele de apărare și le folosesc pentru a coexista în calitate de comensale sau, în condițiile favorabile create de lezarea țesutului, se creează avantajul producerii infecției clinice.

IgA este foarte importantă pentru protecția tuturor suprafețelor mucoase. În tractul respirator superior predomină IgA_1. La copiii atopici (cu condiții predispozante pentru infecții ale tractului respirator), în secrețiile nazofaringiene, nivelul IgA_1 clivat este mai crescut decât la copiii sănătoși. Situația coincide cu un număr mai mare de bacterii colonizatoare ale tractului respirator superior, producătoare de proteaze ce clivează IgA_1. Unul dintre colonizatori este NTHi.

Tulpinile de *H. influenzae* capsulate produc 3 tipuri de proteaze, care clivează regiunea balama a moleculei IgA_1, rezultând fragmentul Fab monomeric, care-și păstrează parțial capacitatea de a lega Ag, și fragmentul Fc mono- sau dimeric, care-și pierde funcțiile biologice.

Tulpinile necapsulate de NTHi produc numai una dintre cele 3 proteaze ce clivează IgA_1.

Invazia celulelor epiteliale. Deşi considerate neinvazive, s-a demonstrat că NTHi pot să invadeze celulele gazdă, ca o modalitate de a evita răspunsul imun. Tulpinile necapsulate de *H. influenzae* invadează celulele endoteliale şi rămân în interiorul vacuolelor de fagocitoză, legate de membrană pentru o perioadă lungă, fără efect citopatic vizibil (Foxwell, 1998).

Variaţia antigenică a proteinelor membranei externe şi a LOS constituie un mecanism major prin care NTHi evită acţiunea sistemelor efectoare ale răspunsului imun. Tulpinile de NTHi cauzează infecţii, deşi în aparenţă anticorpii specifici sunt detectabili în secreţia salivară şi în ser. Datorită variaţiei antigenice accentuate a OMP şi a LOS, anticorpii sunt ineficienţi.

Diagnosticul de laborator. *H. influenzae* nu se dezvoltă pe geloză sânge decât în prezenţa *S. aureus* care stimulează creşterea coloniilor satelite de *Haemophilus*, deoarece eliberează NAD în mediul extracelular (fig. 199). Din produsele patologice reprezentate de tampoane nazofaringiene, puroi, sânge, LCR se execută frotiuri şi se inoculează mediu cu sânge (geloză chocolat cu sau fără adaos de factori de creştere – IsoVitaleX) (fig. 200–201).

La 24 de ore formează pe geloză chocolat colonii plate, gri-maronii, de 1–2 mm diametru (fig. 200).

Fig. 199. Aspectul satelitismului culturii nehemolitice de *H. influenzae* pe geloză sânge însămânţată cu *S. aureus*.

Fig. 200. Aspectul coloniilor de *H. influenzae* pe geloză chocolat (http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16).

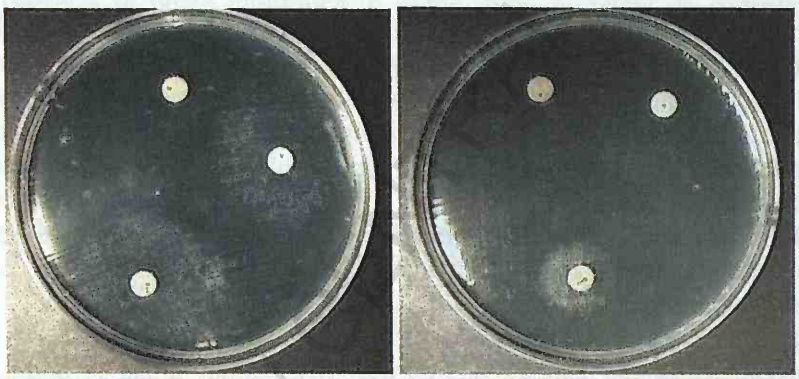


Fig. 201. Evidenţierea dependenţei unei tulpini de *H. parainfluenzae* faţă de factorul V (http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16) şi respectiv a unei tulpini de *Haemophilus influenzae* faţă de factorii X şi V (http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16).

H. influenzae se identifică prin reacţia de aglutinare pe lamă cu anticorpi specifici de tip, producându-se fenomenul de *quellung* (umflare a capsulei), ca şi la pneumococ.

Tratamentul infecţiilor cu *Haemophilus* este reprezentat de penicilină sau cefalosporine de generaţia a treia (în cazul tulpinilor rezistente prin producerea de β-lactamază sau PLP modificate). Profilaxia constă în administrarea de vaccinuri subunitare care conţin polizaharid capsular (timo-independent) asociat cu o proteină, anume anatoxina tetanică (pentru a deveni timo-independent) administrat sub forma a 3 injecţii subcutanate la o lună interval, înainte de 6 luni, cu un rapel la 18 luni.

Testarea sensibilităţii la antibiotice se realizează pe mediu HTM (*Haemophilus* Test Medium) (agar Müller Hinton cu factori de creştere X şi V şi extract de drojdii). Pentru izolatele din LCR se raportează ampicilina (care se utilizează pentru predicţia sensibilităţii la amoxicilină), o cefalosporină de generaţia a III-a, cloramfenicol şi meropenem. Cefalosporinele orale, tetraciclinele şi asocierile cu acid clavulanic pot fi utilizate empiric pentru tratamentul afecţiunilor respiratorii. Tulpinile rezistente la ampicilină şi amoxicilină produc o ß-lactamază de tip TEM-1 care poate fi detectată prin testul

rapid, cromogenic. Detecția de β-lactamazei este indicată la tulpinile izolate din cazuri clinice severe (meningită și /sau bacteriemie) (CLSI, 2009). Tulpinile producătoare de ß-lactamază trebuie raportate ca rezistente pentru toate celelalte ß-lactamice, inclusiv pentru asocierile cu inhibitori, indiferent de rezultatele obținute *in vitro*.

H. ducreyi este o bacterie transmisă prin contact sexual, care produce șancrul moale (cancroidul), un ulcer dureros al organelor genitale externe, similar din punct de vedere al aspectului leziunilor cu șancrul sifilitic. Diagnosticul diferențial față de infecția virală cu herpes simplex și față de limfogranulomatoza venerică este de asemenea necesar. Pentru izolare, se recomandă recoltarea cu tamponul de la baza leziunii ulceroase și însămânțarea direct pe mediul de cultură (geloză chocolat cu 1% IsoVitaleX și vancomicină), incubat la 33°C. Cu o rată mai mică de succes se poate realiza izolarea și din produsul de biopsie rezultată prin puncționarea granuloamelor inghinale (WHO, 2003). Aspectul microscopic de bacili dispuși în bancuri de pește este revelator. Tratamentul se realizează cu ceftriaxonă administrată parenteral sau oral cu biseptol sau eritromicină, timp de 2 săptămâni.

H. aegyptius, numit bacilul Koch-Weeks sau *H. influenzae* biotip III sau *H. influenzae* biogrup *aegyptius*, se aseamănă foarte mult cu *H. influenzae,* fiind agentul etiologic al unei conjunctivite extrem de contagioase și al febrei puerperale braziliene, care se manifestă prin febră, erupții cutanate, șoc și exitus.

H. aphrophilus intră în componența microbiotei normale orofaringiene și este întâlnit în etiologia endocarditelor și a pneumoniilor. Se aseamănă cu *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans.*

H. haemolyticus este hemolitic pe geloză sânge și este prezent în microbiota tractului respirator, producând infecții ușoare la copii la acest nivel.

H. parainfluenzae se aseamănă cu *H. influenzae*, este rezident al mucoasei tractului respirator și ocazional asociat cu endocardite și uretrite. *H. suis* se aseamănă bacteriologic cu *H. influenzae* fiind implicat în apariția complicațiilor post viroză respiratorie la porc.

Bibliografie

Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition Jawetz, Melnick și Adelberg. http:// www.accessmedicine.com

Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1.

http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/phototheque/Pasteurella_multocida_Hemoc.jpg

http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english

WHO. 2003. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, 2nd Edition WW.

http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16

7.4. *Bordetella pertussis*

Genul *Bordetella* cuprinde câteva specii, cea mai importantă din punct de vedere clinic fiind *B. pertussis*, un patogen care produce, exclusiv la om, infecții ale tractului respirator, a căror expresie clinică este tusea convulsivă. *B. parapertussis* produce o entitate clinică asemănătoare. *B. avium* este infecțioasă pentru curci, dar nu pentru organismul uman, *B. bronchiseptica* (*B. bronchicanis*) este infecțioasă pentru iepuri și câini, și ocazional pentru om, la care produce infecții respiratorii și bacteriemii, în special la pacienții imunodeprimați. Recent au fost descoperite noi specii: *B. hinzii*, care produce bacteriemie si infecții de tract respirator, *B. holmseii*, responsabilă de bacteriemie la pacienții imunodeprimați și *B. trematum*, care produce infecții de plagă și otite medii.

B. pertussis este un cocobacil Gram negativ (fig. 202), strict aerob, capsulat, fastidios.

Pe frotiurile colorate cu albastru de toluidină se disting granule metacromatice bipolare. Tulpinile de *Bordetella* sunt catalază și oxidază – pozitive. Ca sursă de carbon și energie, *B. pertussis* metabolizează glucoza, lactoza, dar și o serie de aminoacizi. Acidifică mediul, fără producere de gaze. Tulpinile virulente sunt hemolitice.

Pentru cultivare se utilizează bulion sintetic Stainer-Scholte și geloză sânge Bordet-Gengou, incubate în aerobioză, la 35–37°C (fig. 203).

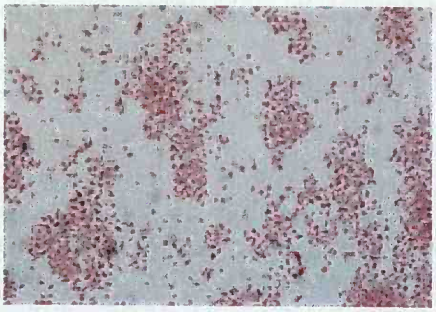


Fig. 202 B. pertussis. Morfologia celulelor pe frontiul colorat Gram (http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/disease-specifics.html).

Fig. 203. Aspectul coloniilor nehemolitice (stg.) şi hemolitice (dr.) de *B. pertussis* pe mediu Bordet-Genou (Hulbert şi Cotter, 2009).

B. pertussis sintetizează o varietate largă de antigene, unele cu rol de adezine, iar altele de toxine. Bacteria aderă la celulele epiteliale ciliate ale tractului respirator prin intermediul unei hemaglutinine filamentoase (FHA), a fimbriilor şi a pertactinei (PRN), şi rămâne localizată la acest nivel.

B. pertussis produce două tipuri de fimbrii, distincte serologic, cu rol în aderenţă la epiteliul tractului respirator superior. Pertactina este o proteină nefimbrială a membranei externe, cu rol în aderenţă.

Pertactina şi FHA conţin secvenţa de aminoacizi arg-glu-asp (RGD), cu rol de mediere a aderenţei la celulele mamaliene.

B. pertussis sintetizează câteva tipuri de toxine: toxina pertussis (PT), toxina adenilat ciclază (ACT), citotoxina traheală (TCT), toxina dermonecrotică (DNT).

Toxina pertussis este cea mai studiată şi produce cele mai multe activităţi biologice *in vivo*: leucocitoză, eliberarea histaminei din mastocite, stimulează secreţia insulinei, are activitate mitogenică. Este o toxină cu structură clasică de tip AB. Molecula de toxină se leagă prin subunitatea B de receptorii celulari, ulterior fiind internalizată. În citosol, subunitatea A catalizează adenozin 5'difosfat (ADP)-ribozilarea unui grup de proteine reglatoare ale sintezei guaninei. Consecinţa imediată este creşterea activităţii adenilat-ciclazei în celula gazdă.

Toxina adenilat ciclază (ACT) intră în celula gazdă, fiind activată de o calmodulină. Efectul său constă în conversia ATP în AMP ciclic şi creşterea nivelului AMPc în celula gazdă. *In vitro*, pe mediul cu sânge, ACT are efect hemolitic. ACT face parte din familia toxinelor bacteriene RTX, care au în comun o serie de secvenţe nonamerice repetate de aminoacizi, la capătul C al moleculei.

Citotoxina traheală este acidul anhidromuramic, legat cu un fragment dizaharid-tetrapeptid peptidoglicanic, eliberat de celulele bacteriene în faza de creştere. La om, TCT inhibă sinteza ADN în celulele ciliate ale traheii, produce extruzia celulelor ciliate din epiteliul căilor respiratorii superioare, măreşte frecvenţa celulelor cu deficit numeric al cililor şi este toxică pentru alte celule epiteliale. Diminuarea activităţii cililor perturbă grav rata de *clearance* mucociliar a epiteliului respirator. Astfel, eliminarea secreţiei mucoase şi a resturilor celulare se face exclusiv prin tuse.

Toxina dermonecrotică (DNT) produce vasoconstricţie şi necroză după injectarea subdermică la şoarece.

Lipopolizaharidul (LPS) este un factor de patogenitate, deoarece produce leziuni ale celulelor epiteliale ale tractului respirator superior şi este imunogenă.

In vitro, *B. pertussis* supravieţuieşte în monocitele umane şi în alte celule mamaliene. Eliminarea celulelor infectate *in vivo* cu agentul patogen este, probabil, mediată de imunitatea celulară. Imunitatea consecutivă infecţiei previne colonizarea epiteliului tractului respirator, iar imunitatea postvaccinare este protectoare faţă de efectele toxinelor.

B. pertussis prezintă o serie de mecanisme de evaziune a sistemului imunitar al gazdei. Antigenele secretate de *B. pertussis* sunt imunosupresoare. Citotoxina traheală lizează celulele ciliate ale tractului respirator superior şi împiedică eliminarea celulelor bacteriene, a mucusului şi a resturilor celulelor epiteliale din căile aeriene. *Clearance*-ul mucociliar este prima linie de apărare a epiteliului respirator, iar incapacitatea funcţională a cililor creează condiţii favorabile infecţiilor bacteriene secundare. Toxina adenilat ciclază şi toxina pertussis inhibă funcţia celulelor limfoide, prin inducerea unor niveluri intracelulare crescute de AMPc. Cele două toxine acţionează sinergic la nivelul

epiteliului respirator şi reduc capacitatea de migrare chimiotactică şi fagocitară a PMN, a monocitelor sanguine, a macrofagelor alveolare şi a limfocitelor. O altă cale de evitare a răspunsului imun este variaţia antigenică a fimbriilor, eveniment ce se produce cu frecvenţă mare la tulpinile infecţioase. Celulele de *B. pertussis* pot fi afimbriate sau pot avea unul sau două tipuri de fimbrii.

Expresia coordonată a acestui arsenal de factori de virulenţă este reglată de operonul *bvg* (*bordetella virulence genes*) sau *vir*, care acţionează prin mecanismul sistemelor de reglare cu două componente, existente şi la alte specii bacteriene (Todar, 2004) (fig. 204).

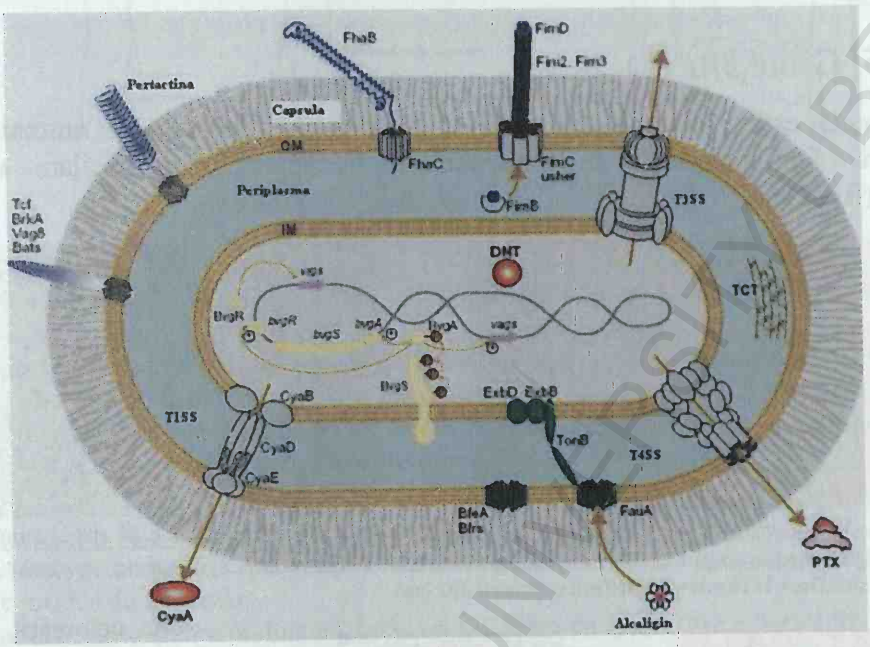


Fig. 204. Reglarea expresiei factorilor de virulenţă prin intermediul operonului *bvg* (Locht et al., 2001) (cya- adenilat ciclaza, alcaligin- siderofor, PTX- toxina pertussis, Fim- fimbrii, fha- fitohemaglutinina).

B. pertussis trăieşte perioade scurte în afara organismului uman. Sursa de infecţie este pacientul în stadiul cataral timpuriu al bolii. Contagiozitatea este mare. Copiii sub vârsta de 5 ani sunt cei mai sensibili. Bacteria se transmite pe cale respiratorie: aderă repid la celulele epiteliale ale traheii şi bronhiilor, unde se multiplică şi interferă cu mişcarea cililor. Procesul infecţios este localizat: bacteria nu trece în sânge, dar produce toxine cu efect necrotic. Epiteliul se infiltrează cu PMN.

Perioada de incubaţie este de 2 săptămâni. Procesul patologic produs de *B. pertussis*, care se manifestă cu predilecţie la copii, parcurge următoarele faze clinice: faza catarală durează 7–21 de zile de la momentul infecţiei şi este caracterizată de simptome nespecifice, asemănătoare răcelii comune; faza de stare (sau paroxistică) durează 2–4 săptămâni, marcată de tuse violentă şi inspiraţie zgomotoasă caracteristică acestei maladii, poate fi însoţită de cianoză, limfocitoza (16000–30000/μL), vomă, epuizare caşectică severă şi moarte; faza de convalescenţă, cu episoade de tuse a căror frecvenţă scade progresiv, durează 3–4 săptămâni. Maladia are o incidenţă semnificativă şi la adulţi.

Mecanismul major de protecţie a organismului uman faţă de infecţia cu *B. pertussis* este sinteza anticorpilor neutralizanţi. Titrul anticorpilor specifici faţă de toxina pertussis, hemaglutinina filamentoasă, pertactină şi fimbrii, se corelează cu un nivel crescut de protecţie faţă de infecţie. Dacă se produce, infecţia secundară este uşoară.

Infecţia neletală cu *B. pertussis* conferă protecţie de lungă durată. La pacienţii trecuţi prin maladia infecţioasă titrul IgA specific în ser şi salivă creşte semnificativ, ceea ce sugerează rolul protector al anticorpilor din secreţiile mucoase.

Vaccinul folosit pe scară largă, din anii '50, conţine celule virulente omorâte de *B. pertussis*, administrate în asociaţie cu anatoxinele difterică şi tetanică (vaccinul DTP). Vaccinarea începe la vârsta de 2 luni, în 3 doze repetate, urmate de două rapeluri la 4–6 ani. Vaccinul reduce incidenţa infecţiei, dar este reactogen (produce efecte locale): durere locală, eritem, edem, febră la 30–70% dintre cei vaccinaţi.

Bibliografie selectivă

1. http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/disease-specifics.html
2. Hulbert R., Cotter P.A. 2009. Laboratory Maintenance of *Bordetella pertussis.* Current Protocols in Microbiology
3. Wood G. E., Friedman R. L. 1999. *Bordetella.* Infection and Immunity. EI, vol. 1, p. 377, Ed. Peter Delves, Ivan M. Roitt
4. Todar K. 2005. Todar's Online Textbook of Bacteriology. www.textbookofbacteriology.net
5. Locht C., Antoine R., Jacob-Dubuisson. 2001 F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. Current Opinion in Microbiology, 4, 1: 82–89

7.5. Genul *Brucella*

Brucella este o bacterie obligat-parazită a organismului uman şi animal, cu localizare intracelulară (fig. 205). Este un cocobacil, cu frecvente forme bacilare, aerob, imobil, nesporulat (fig. 206).

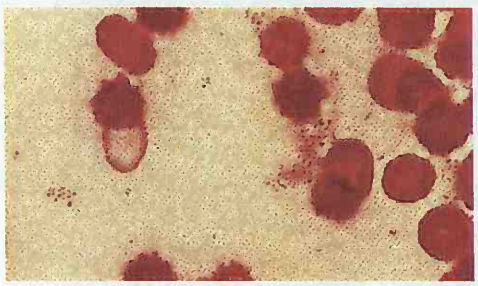


Fig. 205. Brucella melitensis - frotiu de sânge colorat Gram (http://www.google.at/imgres?imgurl=http://faculty.matcmadison.edu/mljensen/111CourseDocs/111Review/Unit1Review/BrucellaBC.jpg).

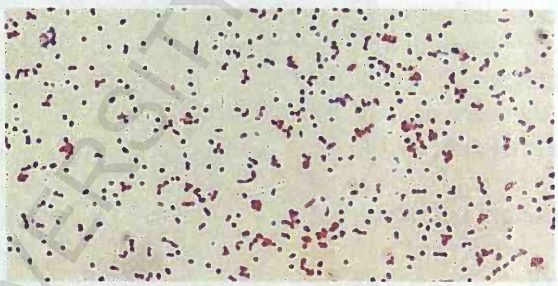


Fig. 206. Frotiu din cultură de *Brucella* – colorație Gram (x1000) (http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/202955).

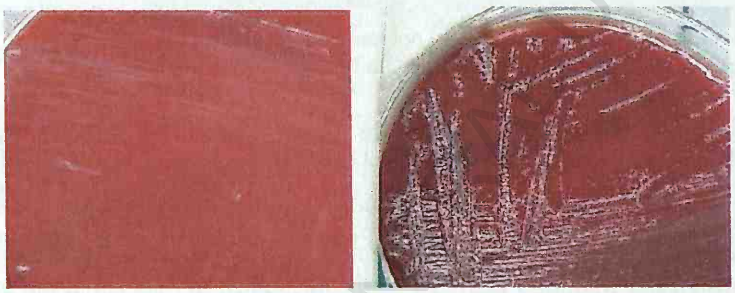


Fig. 207. Aspectul culturii de *Brucella* pe geloză sânge la 24 respectiv 48 de ore (http://doh.sd.gov/Lab/BT/Brucella/colony.aspx).

Se colorează Gram negativ sau Gram variabil (fig. 206). Genul *Brucella* cuprinde mai multe specii, infecţioase pentru diferite specii de animale: *B. melitensis* – pentru caprine; *B. suis* – pentru porcine; *B. abortus* – pentru cornute; *B. canis* – pentru câine. Alte specii infectează alte animale. Studiile de secvenţiere ADN sugerează că tulpinile de *Brucella* aparţin unei singure specii, *B. melitensis*, cu varietăţi multiple.

Brucella este o bacterie adaptată la parazitismul intracelular, iar necesităţile nutritive la cultivarea pe medii artificiale sunt complexe. Unele tulpini au fost cultivate pe medii sintetice, care conţin aminoacizi, vitamine, glucoză şi săruri. Izolarea se face pe mediu cu sânge şi culturile se dezvoltă în aerobioză, cu excepţia tulpinilor de *B. abortus* care necesită o atmosferă de 5–10% CO_2 (fig. 207).

Speciile g. *Brucella* metabolizează glucoza, fără acidifierea mediului, sunt pozitive pentru testul catalazei şi oxidazei, produc H_2S, reduc nitraţii la nitriţi. Temperatura de pasteurizare a laptelui are efect letal asupra bacteriei.

La om, bruceloza este o infecţie profesională a agricultorilor, crescătorilor de animale, veterinarilor, personalului abatoarelor. Calea de intrare este cea digestivă, prin laptele sau prin aerosolii infectaţi care ajung în contact cu membranele mucoase şi prin leziunile tegumentare, consecutiv contactului cu animalele şi ţesuturile infectate (fig. 208).

De la poarta de intrare, *Brucella* ajunge pe cale limfatică, trecând prin ganglionii regionali, ductul toracic şi torentul sanguin, în ţesuturile parenchimatoase (fig. 209), unde este fagocitată de macrofagele rezidente şi determină formarea *granuloamelor*, care sunt rezultatul proliferării mononuclearelor şi fibrozei şi sunt formate din celule gigante în care se găseşte agentul bacterian. Zona centrală se necrozează, reţeaua de fibre periferice se dezorganizează şi agentul infecţios este eliberat.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

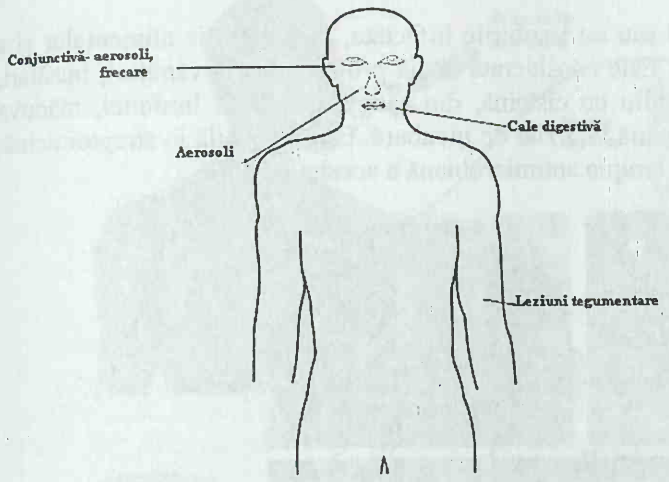


Fig. 208. Porţile de intrare pentru *Brucella* în organismul gazdă (Baron, 1996).

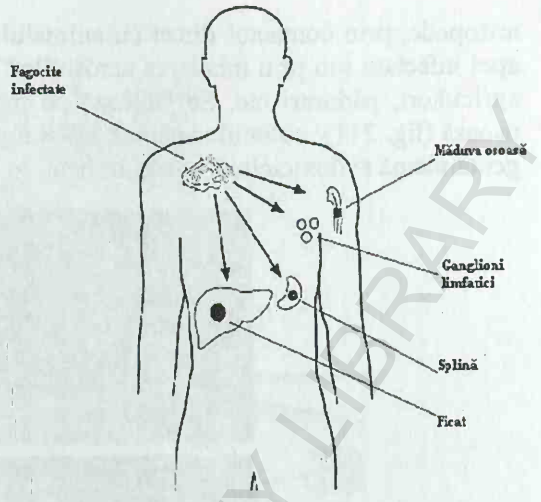


Fig. 209. Localizarea proceselor patologice cauzate de infecţia cu *Brucella* (Baron, 1996).

Speciile de *Brucella* au grade diferite de virulenţă, reflectată în tipul de leziuni (supurative sau nesupurative), de granuloame (cazeoase = necrotice sau necazeoase), în intensitatea reacţiei de hipersensibilitate întârziată la *brucelină* (un amestec de proteine secretate de celulele bacteriene). Răspunsul imun la endotoxină poate să amplifice efectele patologice ale infecţiei.

Ţesutul placentar şi membranele fetale ale cornutelor, porcinelor, ovinelor, caprinelor sunt bogate în *eritritol*, un factor de creştere pentru *Brucella*, care manifestă un tropism marcat pentru localizarea în sfera genitală. Rezultatul infecţiei este avortul. Eritritolul lipseşte în placenta umană şi avortul nu este produs de *Brucella*.

La om, *bruceloza* (febra ondulantă, insulară sau febra de Malta) are o perioadă de incubaţie de de 1–6 săptămâni, o fază acută cu stare de rău general, febră şi bacteriemie, urmată de stadiul infecţiei cronice, cu localizare în mai multe ţesuturi şi extinsă pe o perioadă de câţiva ani.

Pentru *diagnosticul* bacteriologic, sângele sau aspiratul din ganglionii limfatici sau din măduva osoasă se însămânţează pe mediu agarizat special (agar *Brucella*) pentru izolarea agentului infecţios. Coloniile sunt mici, nehemolitice.

Titrul IgM creşte în primele 7 zile de infecţie acută, atinge nivelul maxim la 3 luni şi rămâne ridicat pe toată perioada infecţiei cronice. Titrul IgG are o dinamică mai lentă: creşte semnificativ la 3 săptămâni. Pentru diagnosticul serologic se practică reacţia de *aglutinare* cu antigen *Brucella* standard, omorât, fenolizat. Titrul aglutinant mai mare de 80 unităţi este indiciul unei infecţii active.

7.6. Francisella tularensis

Francisella tularensis (Tulare = localitate din California, unde agentul patogen a fost izolat pentru prima dată) este o bacterie facultativ intracelulară, de formă cocobacilară, Gram negativă, oxidazo-negativă, imobilă, parazită la animalele sălbatice (fig. 210).

Grupul "F. tularensis" cuprinde patru biovarietăţi sau subspecii: "tularensis" (sau tipul A), predominant în America de Nord, este cel mai virulent, fiind asociat cu pneumonia letală, "palearctica" ("holarctica" sau tipul B) dominant în Asia şi Europa, mai puţin virulent, rareori asociat cu cazuri letale, "novicida", reuneşte tulpini nevirulente, care însă pot produce infecţii la pacienţi imunodeprimaţi şi "mediasiatica", dominant în Asia centrală. Se transmite la om prin

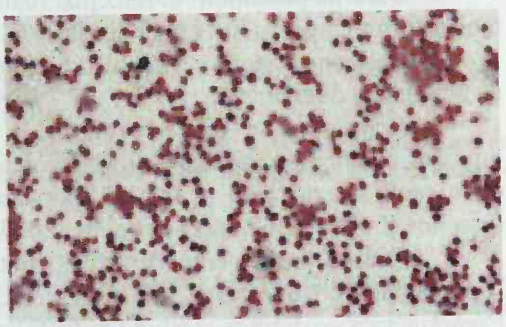


Fig. 210. F. tularensis. Cocobacili Gram negativi (CDC/Larry Stauffer, Oregon State Public Health Laboratory).

artropode, prin contactul direct cu animalul sau cu țesuturile infectate, prin ingestia alimentelor și a apei infectate sau prin inhalarea aerosolilor. Este considerată boală profesională la vânători, bucătari, agricultori, pădurari etc. Se izolează pe mediu cu cisteină, din sânge, ganglioni limfatici, măduva osoasă (fig. 211), coloniile apărând la 48 h până la 5 zile de incubare. Este sensibilă la streptomicină, gentamicină și doxiciclină, agenți utilizați în terapia antimicrobiană a acestei infecții.

Fig. 211. Cultură de 48 de ore de *F. tularensis* pe mediu cu cisteină (http://en.academic.ru/ pictures/enwiki/70/Francisella_tularensis_01.jpg), cu sânge de berbec http://slph.ncpublichealth.com/bioterrorism/FrancisTularensis.asp), Agar tamponat cu extract de levuri, Charcoal și geloză chocolat (http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/tularensis.htm).

F. tularensis este foarte infecțioasă. Inhalarea aerosolilor cu circa 50 de celule, penetrarea prin microleziuni ale tegumentului sau a mucoaselor, poate să inițieze procesul infecțios. Formele clinice variază în funcție de poarta de intrare în organism: pseudogripale; ulcero-ganglionare brachiale cu extensie subclaviculară; faringo-ganglionare cu adenopatie; oculare – sindrom Parinaud cu adenopatie; cutanate – eritem polimorf; febrile sau tifoide; meningeene; pulmonare grave. Incubația este scurtă, debutul brusc, cu febră ridicată, frisoane, cefalee, astenie, tuse, mialgie, dureri abdominale, diaree. Nu există transmitere interumană, iar la om maladia este rareori mortală.

În cazul porții de intrare cutanate, la locul infecției, în 2–6 zile după contactul contaminant, apare o papulă* ulcerantă inflamată.

* Papula este o leziune tegumentară datorată dilatării vaselor sanguine dermice și apariția edemului infiltrat cu leucocite. Ganglionii cresc în volum și se necrozează.

Dacă agentul patogen este inhalat produce tularemia pulmonară (fig. 212).

Datorită potențialului infecțios foarte înalt, *F. tularensis* este o potențială armă biologică, fiind inclusă printre agenții infecțioși de clasă A.

Antigenele majore, un polizaharid și o proteină ale suprafeței celulare, dau reacție încrucișată cu antigenele de *Brucella*.

F. tularensis, odată pătrunsă în organism, infectează macrofagele, blochează fuziunea fagolizosomală, prevenind astfel acidifierea, distruge fagosomii și ajunge în compartimentul citosolic, unde proliferează rapid și induce apoptoza celulei gazdă, bacteriile eliberate inițiind un nou ciclu infecțios (fig. 213) (Clemens și colab., 2004).

Factorii de virulență identificați sunt reprezentați de pilii de tip IV implicați în aderența inițială la membrana celulei gazdă infectate, hemolizine (NLyA), ce prezintă omologie cu cele produse de *Pseudomonas aeruginosa* (HlyA) și fosfolipaze C (AcpA). La *F. tularensis* au fost identificate o serie de proteine de tip ABC (ATP *binding cassette*), implicate probabil în secreția factorilor de virulență (Atkins et al., 2006). Distrugerea fagosomului și proliferarea intracelulară sunt dependente de prezența unei proteine de 23-kD (IglC) codificată de o genă localizată pe o insulă de patogenitate.

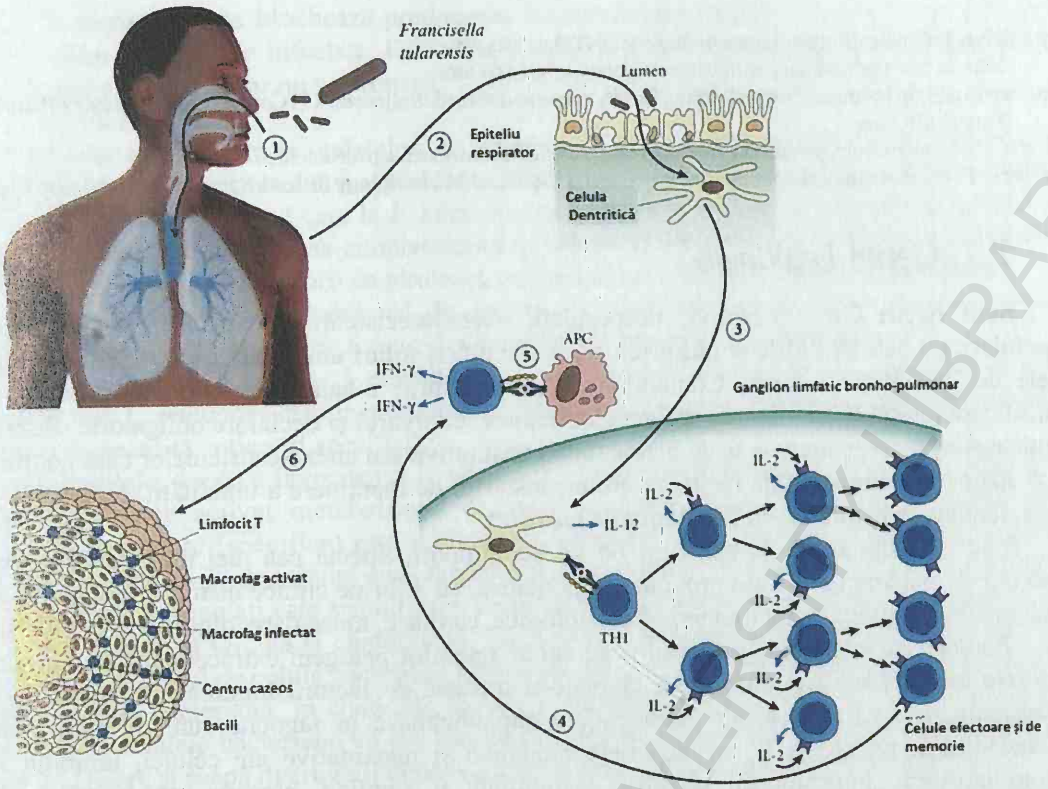


Fig. 212. Mecanismele patogenezei tularemiei pulmonare: *F. tularensis* ajunge în țesutul pulmonar odată cu inhalarea aerosolilor contaminați (1), traversează lamina propria a bronhiolelor respiratorii *via* celulelor M (2), antigenele bacteriene prelucrate sunt preluate de celulele dendritice (3) și transportate la nivelul ganglionilor limfatici regionali, unde sunt prezentate limfocitelor Th1, care proliferează (4), produc INFγ și activează macrofagele (5); persistența *F. tularensis* determină formarea granuloamelor (6) (Murray, 2009).

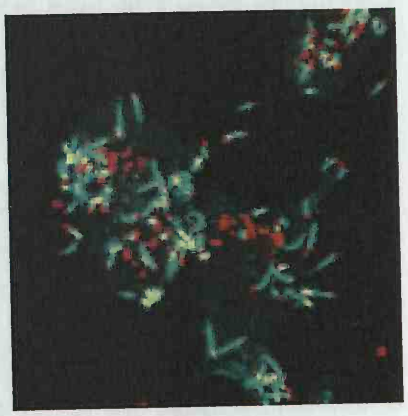


Fig. 213. F. tularensis în citosolul macrofagelor infectate. Imagine de microscopie confocală (http://www.necker.fr/u1002/html/team2.html).

Bibliografie selectivă

1. Atkins H., Dassa E., Walker N., Griffin K., Harland D., Taylor R., Duffield M., Titball R. 2006. The identification and evaluation of ATP binding cassette systems in the intracellular bacterium "Francisella tularensis" Res Microbiol 157 (60) 593–6.
2. Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. 1996.
3. CDC/Larry Stauffer, Oregon State Public Health Laboratory
4. Clemens D. L., Lee, B. Y., Horwitz, M. A. 2004. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infection and Immunity*, 72(6): 3204–3217.
5. http:// en. academic. ru/ pictures/enwiki/70/Francisella_tularensis_01.jpg
6. http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/202955
7. http://doh.sd.gov/Lab/BT/Brucella/colony.aspx

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. http://slph.ncpublichealth.com/bioterrorism/FrancisTularensis.asp
http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/tularensis.htm
9. http://www.google.at/imgres?imgurl=http://faculty.matcmadison.edu/mljensen/111CourseDocs/111Review/Unit1Review/BrucellaBC.jpg
10. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=74
11. Murray P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. 2009. Medicial Microbiology (6th ed.). Philadelphia: Mosby Elsevier.

7.7. Genul Legionella

Sunt bacili Gram negativi, nesporulați, neacidorezistenți, necapsulați, alungiți, facultativ intracelulari, cu habitat hidric și hidro-teluric – ape dulci, soluri umede, larg răspândiți în natură și în rețelele de distribuție a apei. Contaminarea se face prin inhalarea aerosolilor. Infecția necesită diagnosticare rapidă (identificarea antigenelor urinare, cultivare) și declarare obligatorie. Rezervoarele potențiale sunt reprezentate de toate elementele constitutive sau anexele sistemelor care conțin o sursă de apă stagnantă (conducte de răcire a aerului, instalații de menținere a umidității, rezervoare de apă, piscine, fântâni, echipamentele din stațiunile termale).

S-au determinat 46 de specii și 64 de serogrupuri. Specia cea mai importantă în patologia umană este *L. pneumophila* care provoacă legioneloza, cu 3 forme clinice distincte: boala legionarilor, febra Pontiac și forme extrapulmonare: hematologice, cardiace, musculare, digestive, retinite, sinuzite.

Factorii de virulență sunt diferiți de cei ai agenților patogeni extracelulari, care au dezvoltat numeroase mecanisme prin care evită fagocitoza mediată de factorii humorali protectori ai gazdei. Mecanismele prin care bacteriile intracelulare supraviețuiesc în fagocite sunt diferite: localizarea extrafagosomală, rezistența la mecanismele oxidative și neoxidative ale celulei, inhibiția fuziunii fagosom-lizosomi, întreruperea activării fagocitului și implicit blocarea producerii radicalilor intermediari ai O_2.

Studiul interacțiunii *Legionella*-fagocit, *in vitro*, nu a evidențiat însă nici unul dintre mecanismele prin care alte bacterii scapă distrugerii intracelulare. *L. pneumophila* este fagocitată și rămâne localizată în interiorul fagosomului. Studii recente au demonstrat faptul că *Legionella* utilizează sistemul de secreție de tip 4 (T4SS) numit Dot/Icm pentru a injecta în citoplasma celulei infectate efectori care interceptează proteinele și veziculele transportoare ale gazdei, transformându-le într-un compartiment protector, similar reticulului endoplasmic, în care se multiplică. Proteinele efectoare sunt unice și nu prezintă omologie cu cele ale altor specii bacteriene. Celulele bacteriene defective pentru T4SS dot/Icm nu pot supraviețui în macrofage (Machner și colab., 2006, 2007) (fig. 214).

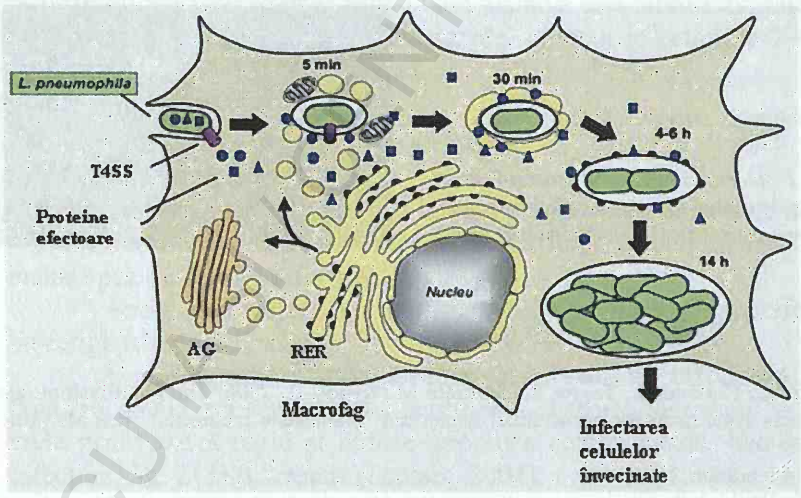


Fig. 214. Interacțiunea *L. pneumophila* cu celula gazdă. Bacteria utilizează sistemul de secreție de tip 4 (Dot/Icm T4SS) pentru a descărca în citoplasma celulei gazdă o multitudine de proteine efectoare (figurate în negru), prin care patogenul recrutează vacuolele de transport ale celulei gazdă pentru a se multiplica (Machner et al., 2009).

După contactul inițial, *Legionella* declanșează creșterea ratei metabolice a fagocitului (neutrofile și monocite). Bacteriile genului *Legionella* sunt sensibile la radicalii intermediari ai reducerii O_2, produși de fagocite. *L. pneumophila* nu inhibă fuziunea fagosom-lizosom. La nivel celular, patogeneza *Legionella* se datorează factorilor bacterieni care *blochează activarea fagocitelor.*

Legionella eliberează doi factori care inhibă activarea fagocitului:

– o *fosfatază* care blochează producerea intermediarilor reactivi ai O_2 (în special O_2^-), de către neutrofilele infectate. Fosfataza blochează formarea mesagerilor secundari şi astfel semnalul activator nu se propagă;
– *o citotoxină.*

Capacitatea invazivă a celulelor de *Legionella* sau supravieţuirea şi multiplicarea este favorizată de alţi factori: o proteină a suprafeţei – *Mip* (*p*roteina care favorizează *i*nvazia *m*onocitelor), *fosfolipaza C, o protein- kinază* care la *L. micdadei* catalizează fosforilarea substratului celulei gazdă (fosfatidil inozitolul din membrana citoplasmatică şi tubulina). Fosforilarea fosfatidil-inozitolului sau tubulinei poate fi unul dintre factorii de virulenţă, acţionând prin blocarea activării fagocitului.

Alte componente cu posibil rol de factori de virulenţă pot fi *LPS, proteina majoră a membranei externe, proteina de şoc termic* şi *o hemolizină*, denumită *legiolizina.*

In vitro, neutrofilele ingeră celulele de *L. pneumophila* tapetate cu anticorpi specifici şi complement, iar *L. micdadei* este ingerată numai în prezenţa serului uman ca sursă de complement opsonizant (nu necesită anticorpi specifici).

Neutrofilele, după ce fagocitează *L. micdadei*, par iniţial să funcţioneze normal, adică imediat după fagocitoză este activat metabolismul oxidativ. Fuziunea fagosomilor cu granulele primare (azurofile) şi secundare (specifice) este echivalentă interacţiunii cu *S. aureus*, utilizată ca probă de control pozitiv. Însă, la 30 de minute după fagocitoza *L. micdadei*, activarea neutrofilelor ca răspuns la stimulii solubili şi particulaţi este semnificativ depresată, comparativ cu cele care au ingerat *S. aureus* sau *E. coli*. Producerea O_2^-, ca şi chimiotaxia, fagocitoza şi activitatea bactericidă scad semnificativ, proporţional cu numărul de celule bacteriene fagocitate. Factorii care inhibă activitatea fagocitelor sunt eliberaţi de celula bacteriană, în condiţiile specifice din fagolizosom. Inhibiţia activităţii fagocitelor este produsă de celulele bacteriene vii sau omorâte. Probabil că bacteria întrerupe un proces timpuriu al activării celulare şi scapă distrugerii după fagocitoza mediată de neutrofile şi de monocite.

În *fagocitele alveolare*, obţinute prin lavaj bronho-alveolar, examenul electrono-optic a evidenţiat faptul că *Legionella* se multiplică rapid, astfel încât citoplasma se umple cu vezicule ce conţin bacterii şi celulele se lizează. Celulele bacteriene sunt localizate intracelular, în vacuole delimitate de membrane, tapetate cu ribosomi.

Legionella se multiplică în *macrofagele* cultivate *in vitro*, rezultatul fiind liza monostratului.

In vitro, Legionella este ingerată de amoebele din genurile *Acanthamoeba* şi *Naegleria*, care trăiesc în mediile naturale. Dinamica interacţiunii *Legionella* cu amoebele este omologă interacţiunii cu fagocitele umane. Celulele bacteriene sunt ingerate de amoebe în vezicule de fagocitoză şi, în condiţii favorabile, se multiplică până când celula amoebiană se dezintegrează. La amoebe, fagocitoza este nu numai un mecanism de apărare faţă de particulele şi celulele străine, ci este modalitatea principală de ingestie a hranei. Factorii de virulenţă pentru amoebe nu sunt aceiaşi cu factorii de virulenţă pentru fagocitele umane. Astfel, temperatura scăzută a mediului favorizează digestia celulelor de *Legionella* ingerate, iar temperatura mai mare favorizează infecţia şi multiplicarea *L. pneumophila* în amoebe.

Diferitele tulpini de *Legionella* se deosebesc prin modalitatea de a intra în fagocit şi prin evoluţia intracelulară: pentru a fi ingerată de neutrofile, *L. pneumophila* trebuie să fie opsonizată cu anticorpi specifici şi cu proteinele complementului derivate prin activarea pe calea clasică.

Majoritatea bacteriilor *Legionella* sunt înglobate prin fagocitoza convenţională, în cursul căreia bacteria este înconjurată de extensii ale pseudopodelor, până când extremităţile se întâlnesc şi fuzionează pe latura distală a particulei. Unele tulpini de *L. pneumophila* sunt însă ingerate de neutrofilele umane, de monocite şi de macrofagele alveolare, prin mecanismul *fagocitozei spiralate* (*coiling phagocytosis*): un pseudopod al fagocitului se spiralizează în jurul bacteriei, pe măsură ce celula este internalizată. Bacteria fagocitată se găseşte în centrul unei spirale mari, un fagosom tapetat cu ribosomi. Un astfel de fagosom nu fuzionează cu lizosomii monocitului (fig. 215).

Diferitele tulpini de *Legionella* eliberează un număr de enzime *proteolitice* şi *aminopeptidaze*. Unele rămân legate de celula producătoare, iar altele sunt secretate în mediul extracelular de cultivare, cu posibile funcţii de factori de virulenţă: *proteaze, fosfataze, fosfolipaza C.*

Aspectul *citoclastic* al infiltratului celular cu necroza neutrofilelor şi monocitelor se datorează *fosfolipazei C.* Fosfolipaza C acţionează asupra fosfatidil-colinei şi eliberează fosfatidil-colină şi diacil-glicerol. Deoarece fosfatidil-colina este un constituent important al membranei eucariote, acţiunea citolitică a fosfolipazei C poate leza atât celulele inflamatorii, cât şi ţesutul pulmonar.

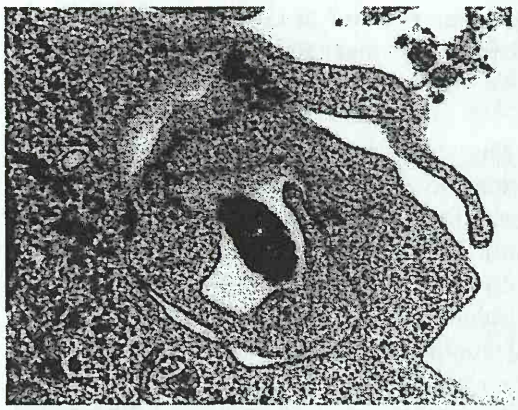


Fig. 215. Fagocitoza spiralată a unei celule de *Legionella* de către un macrofag (http://louisville.edu/medschool/microbiology/graduate-program/microbial-pathogensis/multidisciplinary.html).

Legionella produce o varietate de *aminopeptidaze*. Fenilalanin-aminopeptidaza (izolată în stare pură) ar putea să hidrolizeze peptidele intracelulare ale gazdei.

SOD este ubicuitară la tulpinile de *Legionella*, în timp ce catalaza şi peroxidaza sunt caracteristici variabile.

Numărul mare de factori de virulenţă favorizează supravieţuirea celulei bacteriene în fagocite. *L. pneumophila* se multiplică în PMN până ce lizează celula gazdă, se eliberează şi infectează alte fagocite.

Legionella este un patogen oportunist: infectează femeile în timpul sarcinii, nou-născuţii, persoanele vârstnice, imunocompromise (pacienţii SIDA) sau debilitate. Infecţia este foarte frecvent asociată cu malignitatea (leucemii, limfoame, sarcoame), cu chimioterapia antineoplazică sau imunosupresoare (la persoanele cu transplant sau tratate corticosteroizi), cu hepatita cronică (ciroză sau alcoolism), cu insuficienţa renală, cu diabetul sau cu lupusul sistemic diseminat. Infecţia este de cele mai multe ori asimptomatică la toate grupele de vârstă, pacienţii imunocompetenţi supravieţuiesc legionelozei, dar la cei debilitaţi boala poate avea adeseori o evoluţie fatală. Manifestările clinice sunt mai frecvente după vârsta de 55 de ani. Factorii de risc sunt fumatul, bronşita cronică, emfizemul, tratamentul imunosupresor, chimioterapia antineoplazică, diabetul zaharat.

Legioneloza este o pneumonie acută cu o perioadă de incubaţie 2–10 zile, în care pacienţii prezintă un sindrom pseudogripal cu febră, tuse seacă, cefalee, mialgii, anorexie. În perioada de stare apare febră ridicată, dispnee şi tuse posibil expectorantă, uneori diaree şi alte semne nespecifice. Legioneloza este o pneumonie purulentă, caracterizată prin alveole încărcate cu neutrofile, macrofage, fibrină şi eritrocite.

Majoritatea celulelor de *L. pneumophila* sunt localizate în interiorul celulelor fagocitare. Aproximativ 85% din cazurile de legioneloză se datorează *L. pneumophila*, 50% din totalul proceselor infecţioase fiind produse de serogrupul 1, iar 10% de serogrupul 6.

Trăsătura caracteristică a exudatului este liza celulelor mediatoare ale procesului inflamator, polimorfonucleare şi macrofage, prezente în exudatul pulmonar, proces denumit *leucocitoclazie*. Majoritatea celulelor bacteriene se găsesc în interiorul celulelor fagocitare inflamatorii, în vacuole citoplasmatice delimitate de membrană (fagosomi), o proporţie mică fiind extracelulare (fig. 216).

Imaginile electrono-optice evidenţiază celule de *Legionella* în curs de diviziune. Nu se poate determina dacă bacteriile fagocitate s-au multiplicat intracelular sau au fost fagocitate după iniţierea extracelulară a procesului de diviziune.

Se crede că manifestările clinice depind de gradul de multiplicare intracelulară a *L. pneumophila*:

- numărul celulelor viabile de *L. pneumophila* obţinute prin lavaj pulmonar creşte rapid după infecţie;
- sensibilitatea unei specii la infecţia cu *L. pneumophila* se corelează cu capacitatea bacteriei de a se multiplica în macrofage;
- mutantele deficiente în capacitatea de creştere intracelulară, au virulenţă redusă.

Febra Pontiac se prezintă clinic cu aspect de sindrom gripal (febră, tuse, mialgie), fără pneumopatie. Bacteriile ajung în plămâni odată cu aerosolii, sunt fagocitate de către macrofagele alveolare, supravieţuiesc şi se multiplică în citoplasmă, blocând fuziunea fagosomului cu vacuolele lizosomale.

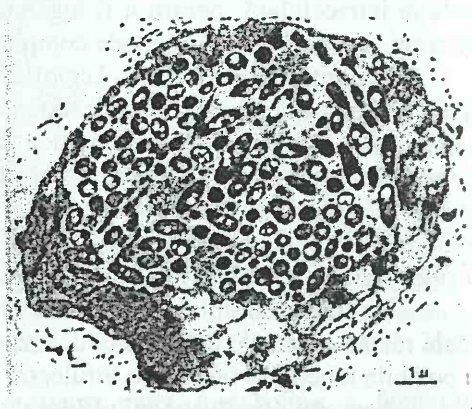


Fig. 216. Macrofag de hamster infectat cu *Legionella* (http://www.q-net.net.au/~legion/Rebecca_Traub_Legionella_Literature_Review.htm).

Macrofagul infectat se lizează. Nu s-a evidenţiat contagiozitate (transmitere interumană). Nu este necesar tratamentul cu antibiotice, importante fiind măsurile de supraveghere a densităţii celulelor de *L. pneumophila* în rezervoarele naturale (care trebuie să fie mai mică de 10^3UFC/l).

Sursa agentului patogen infecţios este *apa contaminată*. *Legionella* creşte în orice bazin de apă caldă, în prezenţa amoebelor şi a altor bacterii. Dar agentul patogen nu trăieşte liber în mediul acvatic. *In vitro*, *Legionella* infectează şi se multiplică în amoebe şi în protozoarele ciliate. Probabil infecţia protozoarelor se produce şi în condiţiile mediului natural, acestea constituind sursa generatoare a agentului bacterian. *Legionella* conţinută în celulele de *Amoeba*, în special în chiştii amoebieni, este deosebit de rezistentă la temperaturi extreme, clorinare etc. şi intră în reţeaua de distribuţie a apei. Turnurile de răcire şi condensorii de evaporare pot fi contaminate cu *L. pneumophila*. Aerosolii care ies din aceste instalaţii disemineză bacteriile, care sunt inhalate şi produc procesul infecţios la persoanele sensibile. Hiperclorinarea apei şi supraîncălzirea pot fi factorii de control ai multiplicării *L. pneumophila* în apă şi respectiv în sistemele de condiţionare a aerului.

L. pneumophila se izolează prin cultivare din spălătura bronşică, din lichidul pleural, din biopsia pulmonară, din sânge. Izolarea din spută este îngreunată de numărul mare de bacterii ale microbiotei normale. Creşte pe medii complexe, de exemplu BCYE (*buffered charcoal-yeast extract agar*) cu α-ketoglutarat +/– antibiotice, la pH 6.9, temperatura de 35°C şi 90% umiditate, după 3 zile de incubare. Coloniile care apar după 24 de ore nu sunt *Legionella*. Coloniile au aspect pleomorf şi pot fi transparente sau iridescente, roz sau bleu (fig. 217).

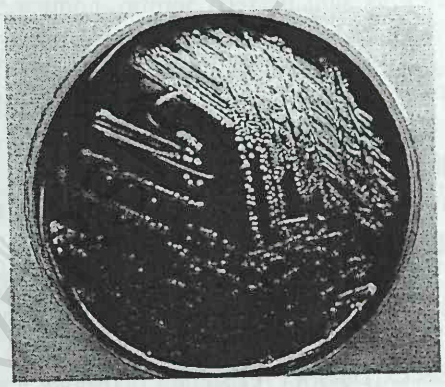


Fig. 217. Coloniil de *L. pneumophila* pe agar BCYE (http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-01-2007.html).

L. pneumophila este considerată un patogen facultativ intracelular, deoarece se multiplică pe medii complexe de laborator. Este obligat aerobă, pozitivă pentru testul catalazei. Deşi *L. pneumophila* hidrolizează amidonul şi oxidează anumite glucide cu o rată scăzută, totuşi metabolismul este de tip oxidativ, nu fermentativ. Cea mai mare parte a glucozei asimilate pare a fi folosită pentru a furniza precursori ai diferitelor căi de biosinteză.

Glucoza este metabolizată pe calea pentozo-fosfatului, rezultând pentoze pentru sinteza acizilor nucleici şi a NADPH, ca potenţial reducător pentru diferite căi biosintetice. Energia este eliberată prin oxidarea aminoacizilor pe calea ciclului acizilor tricarboxilici: serina, treonina şi glutamatul sunt substraturi optime pentru *Legionella*. Acizii organici – lactatul, piruvatul, acetatul, malatul, fumaratul, oxalacetatul – sunt metabolizaţi (stimulează consumul de O_2). *Legionella* sintetizează acizii graşi cu 14–17 atomi de C, în special cu catenă ramificată, predominant fiind izopalmitatul, un acid gras saturat, ramificat, cu 16 atomi de C. Pentru determinarea speciilor de *Legionella* poate fi folosită metoda cromatografiei gaz-lichid.

Pe frotiurile din probele clinice colorate Gram, *L. pneumophila* nu se poate evidenţia. Se poate utiliza metoda fluorescenţei directe, o metodă mai puţin sensibilă decât cultivarea. Tratamentul de elecţie este eritromicina, sau pentru cazurile care nu răspund la tratament, rifampicina.

Bibliografie

1. http://louisville.edu/medschool/microbiology/graduate-program/microbial-pathogensis/multidisciplinary.html
2. http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-01-2007.html
3. http://www.q-net.net.au/~legion/Rebecca_Traub_Legionella_Literature_Review.htm
4. Machner M. P., Isberg R. R. 2006. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. Dev Cell 11:47–56.
5. Machner M. P., Isberg R. R. 2007. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. Science 318:974–977.
6. Machner, M., Aldea M. R., Chen Y., Gaspar A., Thomas A. Modulation of Human Macrophages by the Intracellular Pathogen *Legionella pneumophila*. Ann. Report of the Division of Intramural Research.

4. BACILI GRAM POZITIVI SPORULAŢI. *FAMILIA BACILLACEAE*

Familia *Bacillaceae* cuprinde bacili sporulaţi, distribuiţi în două subdiviziuni: aerobi sau facultativ anaerobi din genul *Bacillus* şi anaerobi grupaţi în genul *Clostridium.* Reprezentanţii genului *Bacillus* sunt bacterii aerobe, componente ale microbiotei solului, în timp ce reprezentanţii genului *Clostridium* sunt bacili anaerobi din microbiota solului, din sedimente, din tractul intestinal animal. Bacilii celor două genuri sunt ubicuitari în sol, deoarece sporii rezistă ani de zile.

Majoritatea speciilor de *Bacillus* şi *Clostridium* nu sunt patogene, dar unele produc boli la om şi animale: *B. anthracis* produce antraxul la ierbivore şi accidental la om, fiind un agent important al bioterorismului şi al războiului biologic; *B. cereus* produce intoxicaţie alimentară şi infecţii oculare sau cu alte localizări; *C. tetani* produce tetanosul; *C. botulinum* produce botulismul; *C. perfingens* este agentul gangrenei gazoase, iar *C. difficile*, al colitei pseudomembranoase.

Reprezentanţii genului *Bacillus* sunt aerobi, sporulaţi (fig. 218), Gram pozitivi sau Gram variabili şi mobili prin flageli peritrihi. Sunt saprobionţi pe materia organică în descompunere (*B. cereus, B. subtilis*). Unele specii (*B. thuringiensis, B. popiliae, B. sphaericus, B. larvae*) sunt patogene pentru insecte. Datorită rezistenţei deosebite a sporilor la condiţiile de mediu, au o distribuţie foarte largă: în regiunile reci, dar şi în izvoarele fierbinţi, în nisipul deşertic, în apa dulce şi în sedimentele marine.

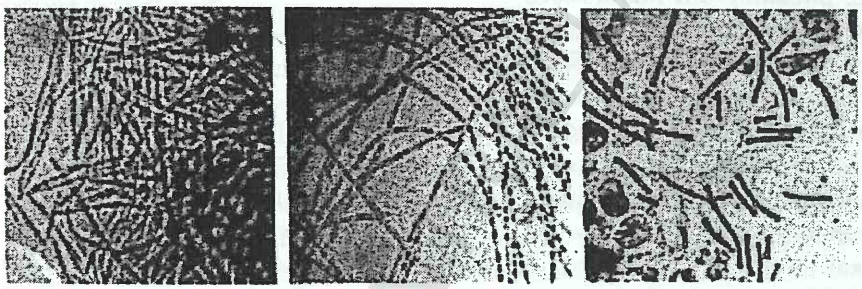


Fig. 218. Celule de *B. anthracis,* aşezate în lanţuri din culturi ale lui R. Koch în 1877 (citat de Todar, 2009).

Unele specii de *Bacillus* sintetizează antibiotice: bacitracina (*B. licheniformis, B. subtilis*), polimixina (*B. polymyxa*), gramicidina (*B. brevis*).

Sporii de *B. stearothermophilus* sunt utilizaţi pentru evaluarea metodelor de sterilizare a instrumentelor chirurgicale, a produselor farmaceutice şi alimentare.

B. thuringiensis este utilizat în combaterea biologică a insectelor: toxina parasporală, de natură proteică, este toxică pentru epiteliul intestinal al larvelor de insecte defoliatoare (*Limanthria dispar*).

Speciile de interes clinic sunt *B. anthracis,* agentul antraxului şi *B. cereus*, care produce toxiinfecţii alimentare (tabelul 23).

Tabelul 23.

Caracterе diferenţiale ale speciilor de *B. anthracis, B. cereus* şi *B. thuringiensis*

	B. anthracis	*B. cereus* şi *B. thuringiensis*
Necesar de tiamină pentru creştere	+	–
Hemoliză*	–	+
Capsulă polipeptidică**	+	–
Liză mediată de bacteriofagul gamma***	+	–
Mobilitate	–	+
Creştere pe mediu hidrat de cloral (2,2,2-tricloro-1,1-etandiol)	–	+
String test	+	–

*Cultură hemolitică de *B. cereus* (stânga) şi de *B. anthracis* (dreapta) (Todar, 2009).

** Cultură mucoidă de *B. anthracis* (Todar, 2009).

**Liza culturii de *B. anthracis* mediată de bacteriofagul gamma (Todar, 2009).

8.1. *Bacillus anthracis*, agentul cauzal al antraxului, boală infecţioasă de prim ordin a ierbivorelor (capră, ovine, bovine, cal), este cel mai cunoscut reprezentant al genului *Bacillus*. Omul se infectează accidental, prin contactul cu animalele infectate sau cu produsele lor. La animale, poarta de intrare este cea digestivă, odată cu furajele contaminate. La om, sporii pătrund prin leziunile tegumentare (antrax cutanat), rareori prin membranele mucoase (antrax gastrointestinal) sau prin inhalare (antrax pulmonar).

Sporii germinează la locul de pătrundere şi induc apariţia unui edem gelatinos şi congestie. Bacilii se diseminează pe cale limfatică şi sanguină, se multiplică în sânge. Celulele necapsulate nu sunt virulente şi nu determină manifestări clinice. Cele capsulate sunt virulente şi induc antraxul clinic.

Virulenţa *B. anthracis* este condiţionată de doi factori:

- un polipeptid (poli-γ-D acid glutamic) din structura capsulei, care-l protejează de fagocite;
- toxină alcătuită din 3 componente proteice: *antigenul protector* (PA), *factorul letal* (LF) şi *factorul edematos* (EF).

Antigenul protector (se numeşte astfel, deoarece răspunsul imun faţă de acest component este protector pentru organismul uman şi animal) se leagă, probabil, de receptorii membranari şi este activat de o protează a celulei, după clivarea unei secvenţe de 20 kDa. Astfel este relevat un situs receptor secundar, pentru care intră în competiţia legării celelalte două componente (factorul letal şi factorul edematos). Complexele PA + LF sau PA + EF sunt internalizate prin mecanismul endocitozei mediate de receptor sub forma complexelor heptamerice. După acidifierea endosomului, subunităţile LF şi EF sunt eliberate în citosol.

Toxina de *B. anthracis* este analogă din punct de vedere funcţional cu toxina holerică, deoarece componentele EF şi LF au rolul componentei active (A), iar componenta PA are rolul de legare de receptorul membranar (B). Antigenul protector pare să formeze canale pentru trecerea ionilor prin membrana celulei eucariote.

Factorul edematos este o adenilat-ciclază dependentă de Ca^{2+}. O altă adenilat ciclază bacteriană intră în structura toxinei de *Bordetella pertussis*. Cele două toxine nu sunt înrudite antigenic (McBride şi Turnbull, 1999).

Factorul letal pare a fi o metaloprotează dependentă de Ca şi de Zn. Complexul LF şi PA determină leziunile tisulare, şocul sistemic şi moartea, mediate de nivelurile înalte de citokine.

Răspunsul imun anti LF şi EF nu este protector.

Patologie. Bacilul se multiplică la locul pătrunderii în organism. Capsula este chimiotactic negativă pentru fagocite şi rămâne intactă din punct de vedere structural, înconjurată de exudat vascular şi un număr mic de leucocite. De aici se diseminează în sânge (fig. 219).

La animalele rezistente, la locul multiplicării primare, bacilii induc afluxul masiv al leucocitelor, capsula se dezintegrează sub acţiunea factorilor litici din plasmă şi bacteriile sunt lizate.

Diagnostic. Bacilii se evidenţiază pe frotiul colorat, în fluidul din leziunea locală, în sânge şi în spută. Se observă lanţuri de bacili mari, imobili, Gram pozitivi.

Pe mediul geloză-sânge apar colonii gri-albicioase, rugoase, nehemolitice.

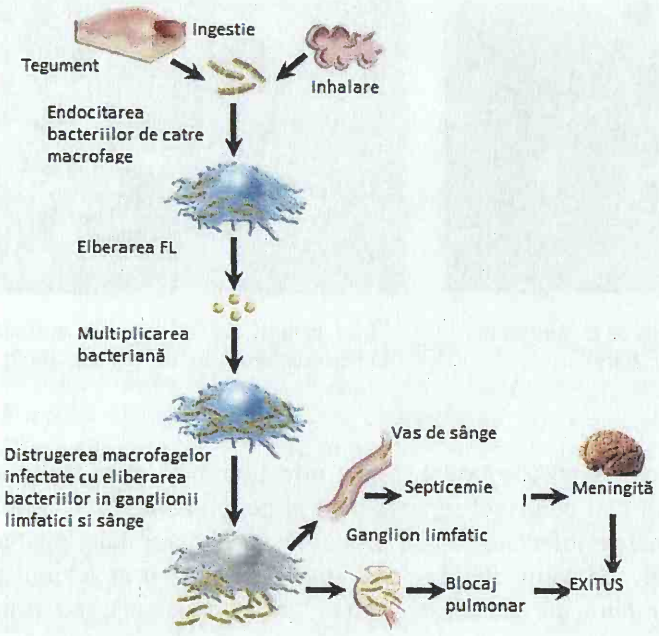


Fig. 219. Mecanismul patogenezei infecției cu *B. anthracis* (Dixon et al., 1999).

Metoda ELISA evidențiază anticorpii anti – EF și LF. Serul se testează în faza acută și la 4 săptămâni după infecție. Creșterea titrului de 4 ori sau titrul unic de 1/32 este considerat ca pozitiv.

Vaccinul de *B. anthracis* preparat de Pasteur a constat din tulpini bacteriene cultivate la temperaturi nepermisive (42–43°C), inhibitoare ale procesului de sporulare. Tulpinile cap^+/tox^- nu stimulează răspunsul imun protector, dar tulpinile cap^-/tox^+ sunt protectoare. O astfel de tulpină obținută de Stern (1937) constituie și în prezent baza producerii vaccinului pentru animale, administrat sub forma sporilor viabili. Vaccinul are dezavantajul unei virulențe reziduale pentru speciile sensibile (capre, lame), dar virulența este mult atenuată în raport cu a tulpinilor sălbatice cap^-/tox^+. Polipeptidul materialului capsular este puțin antigenic și nu pare să inducă un răspuns imun protector după administrarea vaccinului celular.

Vaccinul de uz clinic uman este un filtrat acelular absorbit cu hidroxid de aluminiu (ca adjuvant), al culturilor necapsulate, neproteolitice derivate dintr-o tulpină (V 770) originară dintr-un caz de antrax bovin.

8.2. *B. cereus* este un bacil mare, imobil, sporulat, aerob, Gram pozitiv. Celulele cu lungimea de 3–4 μm, cu capetele în unghi drept, sunt așezate în lanțuri lungi. Este saprobiont în sol, apă, materialele vegetale. Se dezvoltă în alimente, unde secretă o *enterotoxină* și produce intoxicația alimentară.

Intoxicația alimentară produsă de *B. cereus* prezintă două forme clinice distincte:

- *emetică*, asociată cu consumul orezului. *B. cereus* contaminează masiv culturile de orez. Sporii germinează în orezul din alimente, se multiplică și produce enterotoxina în faza de creștere logaritmică sau în timpul sporulării;
- *diareică*, produsă de consumul cărnii. Perioada de incubare este de 1–24 de ore. Intoxicația este asociată cu diaree masivă.

Enterotoxina poate fi sintetizată nu numai în alimente, dar și în lumenul intestinal.

B. cereus este component al microbiotei intestinale normale, astfel că prezența sa în scaun nu este suficientă pentru diagnostic. O densitate de 10^5 celule/g sau mai mare semnifică un dagnostic pozitiv.

Determinanții virulenței la B. cereus:

- *3 fosfolipaze C* (lecitinaza, fosfatidil-colin hidrolaza, fosfatidil-inozitol-hidrolaza). Fosfolipazele au acces la substratul fosfolipidic al membranei celulare în țesuturile care au suferit traumatisme. Deoarece lizează membrana eritrocitară, sunt hemolitice (fig. 220);
- *sfingomielinaza*, de asemenea hemolitică;
- *hemolizina I* (cereolizina), o citolozină termolabilă, activată de sulf. Situsul de legare al acestei citolozine pe membrana citoplasmatică este colesterolul. Interacțiunea hemolizinei I cu colesterolul produce microperforații membranare, care perturbă controlul echilibrului ionic. În sânge, hemolizina I este inactivată de colesterol, ceea ce limitează efectele patologice în infecțiile naturale;
- *hemolizina II*, alcătuită din două subunități (cea care mediază legarea și cea activă). În infecțiile digestive naturale, hemolizina II are efecte necrotice asupra enterocitelor, ceea

ce explică stările diareice consecutive ingestiei alimentelor cu contaminare intensă. Activitatea sa nu este neutralizată de colesterol;

– *hemolizina III*, denumită factorul emetic, este o proteină sau un grup de proteine cu greutate moleculară mică, foarte stabile la căldură, la acțiunea proteazelor și la variația pH. Este un dodecadepsipeptid*.

* Depsipeptidele sunt polipeptide care conțin atât legături esterice, cât și peptidice. Depsipeptidele naturale sunt produse de către microorganisme, au în general structură ciclică și activitate antibacteriană (de exemplu, actinomicina, eniatina, valinomicina).

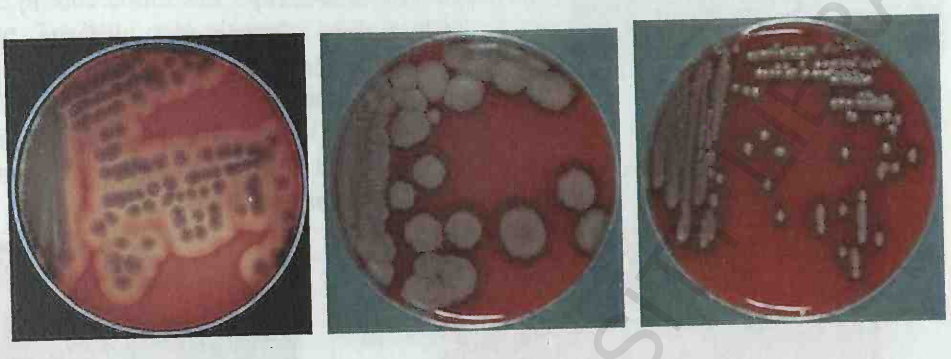


Fig. 220 B. cereus este intens hemolitic pe geloză sânge (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/).

8.3. *Genul Clostridium* cuprinde mai multe specii de bacterii din mediu sau componente ale microbiotei intestinale, responsabile de diferite entități clinice importante: *Cl. botulinum*, agentul botulismului, *Cl. tetani*, agentul tetanosului, *Cl. perfringens*, ce produce intoxicații alimentare, infecții anaerobe ale plăgilor, gangrena gazoasă și *Cl. difficile*, agentul colitei pseudomembranoase. Clostridiile sunt bacili sporulați, Gram pozitivi, mobili, a căror creștere are loc, de obicei, în condiții anaerobe (fig. 221, 222).

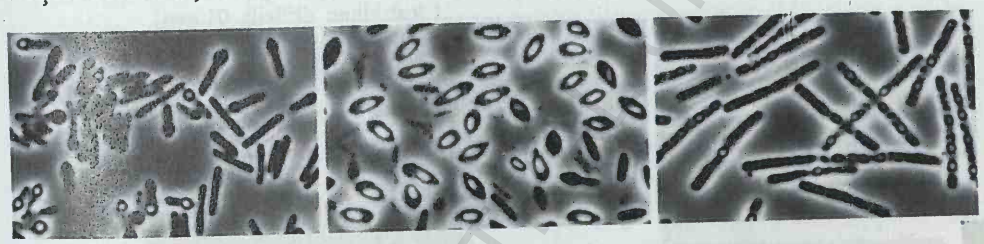


Fig. 221. Celule sporulate de *Clostridium* (Todar, 2009).

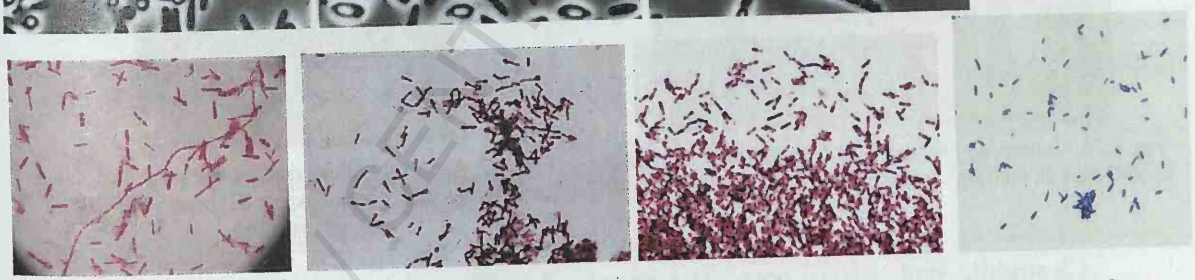


Fig. 222. Morfologia *C. botulinum, C. tetani, C. difficile* respectiv *C. perfringens*, nesporulat, pe frotiul colorat Gram (http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/strandwi_phil; http://microbiology2009.wikispaces.com/file/view/clostridium_tetani.gifhttp://sitemaker.umich.edu/mc5/files/clostridium_difficile.jpg, http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showmorf).

Tabelul 24.

Caracterele diferențiale ale diferitelor specii de *Clostridium* (Brook, 2008).

	C. perfringens	*C. septicum*	*C. novyi*	*C. difficille*	*C. tetani*	*C.botulinum*
Lecitinaza	+	–	+	–	–	–
Spor	subterminal	subterminal	central	subterminal	subterminal	terminal
Mobilitate	–	+	+	+	+	+
Beta hemoliză	+	+	+	–	+	+
Fermentarea glucozei	+	+	+	+	–	+
Reducerea nitraților la nitriți	+	+	+	–	–	–

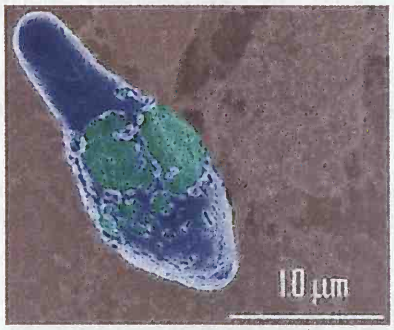


Fig. 223. Spor deformant de *Clostridium botulinum* (http://www.millennium-ark.net/NEWS/08_Health/08_Health_pics/081201.clostridium.jpg).

Clostridium se dezvoltă bine pe medii cu adaus de sânge. Sporii sunt deformanți, foarte rezistenți la temperatură înaltă și la variații extreme de pH, ceea ce le conferă capacitatea de supraviețuire pentru perioade lungi de timp, în sol (fig. 223).

Sunt bacterii saprobionte în sol sau în tractul intestinal al omului și animalelor. Se dezvoltă bine pe medii cu sânge și produc o zonă de hemoliză. Coloniile sunt mari (*C. perfringens*) sau mici (*C. tetani*) (fig. 224–227).

Clostridiile fermentează diferite glucide, descompun frecvent proteinele și sintetizează *toxine*. Laptele este coagulat cu producere de acizi (coagulare acidă), uneori cu producere de gaz care determină fragmentarea și deplasarea cheagului în masa mediului, sau este coagulat sub acțiunea proteazelor (coagulare dulce).

Fig. 224. Colonii de *C. septicum* pe geloză sânge (http://www.eol.org/pages/Clostridium_septicum)

Fig. 225. Colonii de *C: difficile* pe geloză sânge (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0f/Clostridium_difficile_01.png)

Fig. 226. Colonii de 48 de ore de *C. botulinum* pe mediu cu gălbenuș de ou (http://www.biolib.cz/en/image/id27230/).

Fig. 227. Aspectul culturii de *C. tetani* pe geloză sânge (http://www.path.cam.ac.uk/partIB_pract/P27/P27_08-09v01asc.htm).

Clostridiile sunt bacterii potențial patogene, datorită capacității de a elibera exotoxine de o mare diversitate structurală. Multe specii de *Clostridium* eliberează mai mult decât o singură toxină, fiecare cu proprietăți imunogene proprii. De exemplu, s-au identificat 8 tipuri de tulpini de *C. botulinum* și 5 tipuri de tulpini de *C. perfringens*, fiecare tip eliberând toxine diferite din punct de vedere antigenic.

Toxinele clostridiene sunt asemănătoare din punct de vedere al structurii primare: omologia extinsă a aminoacizilor face ca între toxinele secretate de diferite tulpini să existe reactivitate imunitară încrucișată. Reacțiile imune încrucișate s-au înregistrat între toxinele de *C. difficile* și *C. sordelii* sau între toxina tetanică și toxina botulinică, care au mecanisme asemănătoare de acțiune.

Multe clostridii produc o varietate de enzime: colagenaze, proteaze, DN-aze, neuraminidaze, care măresc gradul de patogenitate a acestor bacterii.

Toxinele clostridiene se clasifică în 4 grupe, după efectul patologic major pe care-l produc (tabelul 25):

- *neurotoxine*: toxina tetanică (produsă de *C. tetani*), toxina botulinică (produsă de *C. botulinum*);
- *enterotoxine*: enterotoxina (eliberată de *C. perfringens* tulpini de tip A) produce intoxicația alimentară acută la om; tulpinile iota și ε de *C. perfringens* produc enterotoxemie la oi, viței, miei și cobai; *C. sordelii* produce o toxină hemoragică, asociată cu diaree la viței și oi;
- *histotoxine* sau toxine citolitice produse de unele tulpini de *C. perfringens*, agenții gangrenei gazoase și ai celulitei anaerobe;
- *citotoxine* (toxine ce acționează asupra citoscheletului), produse de *C. difficile*: toxinele A și B ce produc colita sau diareea asociate cu antibioticele la om sau tulburări diareice la animale. Toxinele care alterează citoscheletul produc ruperea actinei F (filamentoase) în celulele sensibile.

Multe dintre toxinele celor 4 grupări au și alte activități: toxina A de *C. difficile* este o enterotoxină puternică, ale cărei efecte au fost demonstrate pe ansa intestinală de iepure și de șobolan.

Tabelul 25.

Mecanismele de acțiune a unor toxine clostridiene.

Specia microbiană	Maladia produsă	Toxinele letale majore	Mecanismul toxicității
C. perfringens tip A	Gangrena gazoasă	Toxina α	Fosfolipaza C dependentă de Ca
C. perfringens tip C	Intoxicație alimentară	Enterotoxina	Modificări de permeabilitate
			Fosfolipază dependentă de Ca
	Gangrena gazoasă	Toxina α	Citotoxină
	Enterita necrotică	Toxina β	
C. septicum	Gangrena gazoasă	Toxina α	Hemolizină, citolitică
C. novyi tip A	Gangrena gazoasă	Toxina α	Citotoxină
C. sordelii	Gangrena gazoasă	Toxina letală	Citotoxină
	Diaree hemoragică	Toxina hemoragică	Citotoxină, enterotoxină
C. tetani	Tetanus	Tetanospasmina	Neurotoxină, clivajul sinaptobrevinei
C. botulinum tip A, B,	Botulism	Toxina botulinică C1, D, E, F, G	Neurotoxină, clivajul sinaptobrevinei
C. difficile	Diaree și colită	Toxina A	Citotoxine, ruperea filamentelor de actină
	Colită pseudomembranoasă asociată cu administrarea antibioticelor	Toxina B	

C. botulinum trăiește în sol și ocazional în fecalele animalelor. Factorul de virulență este toxina botulinică. S-au identificat 8 variante serologice: A, B, C_1, C_2, D, E, F, G, dar efectele farmacologice sunt asemănătoare.

Uneori, tulpinile de *C. botulinum* produc nu numai toxina specifică de tip, ci și o cantitate mică de toxină specifică altui tip (Ab, Af, Ba și Bf).

Toxina botulinică este una dintre cele mai toxice substanțe: doza letală pentru om este 1 μg. Toxina este inactivată la 100°C, în 20 de minute.

Toxina botulinică aparține grupului toxinelor neuroparalitice și are un potențial toxic extrem de ridicat.

Tipurile A, B, E și F produc cele mai frecvente cazuri de botulism la om, iar tipurile C, D și E la animalele domestice și sălbatice. Tipul G s-a izolat din sol, dar nu a fost determinat drept cauză a

botulismului la om sau la animale. Toate tulpinile producătoare de neurotoxină botulinică (A-F) produc lipază, detectată ca o zonă iridescentă care înconjură colonia pe mediul cu gălbenuş de ou. *C. botulinum* care produce toxina de tip G nu produce lipază şi nu fermentează glucidele.

Toxina botulinică este intracelulară şi este eliberată după liza mecanică sau enzimatică a peretelui celular. Tulpinile bacteriene neproteolitice produc toxine de tip C, D, E şi G, care îşi exprimă întregul potenţial toxic numai în prezenţa tripsinei. Tripsina clivează molecula de toxină în două polipeptide, care se separă după reducerea punţii S-S. Activarea toxinei botulinice poate avea loc în tractul intestinal, sub acţiunea enzimelor proteolitice, înainte de absorbţia în sânge.

Toxina de tip A a fost purificată şi cristalizată ca un complex cu greutate moleculară de 900 kDa, format din neurotoxina de 120–150 kDa şi o hemaglutinină, căreia i se atribuie rol protector faţă de enzimele tractului digestiv, înainte de absorbţia în fluxul sanguin. Neurotoxina este sensibilă la enzimele digestive şi la pH acid. Din această cauză, toxina în stare nativă, necomplexată, nu poate să producă intoxicaţia.

Toxina E este produsă sub forma unui complex format din neurotoxină şi câteva componente netoxice, cu greutate moleculară de 350 kDa.

Tulpinile bacteriene proteolitice au o enzimă asemănătoare tripsinei, care activează toxina.

Botulismul este cauzat de ingestia alimentelor conservate, care conţin toxina preformată, sintetizată de *C. botulinum*. Cazurile de botulism asociate cu rănirea se datorează multiplicării bacteriei în ţesutul lezat şi producerii toxinei. Perioada de incubaţie, prelungită între momentul ingestiei alimentului suspectat şi apariţia simptomelor, a generat teoria toxiinfecţiei: *C. botulinum* ingerat se multiplică în tractul intestinal şi eliberează toxina.

Diagnostic. Toxina botulinică se evidenţiază în serul pacienţilor şi în alimente. Injectarea probei contaminate la şoareci produce efecte letale imediate. În cazurile de botulism infantil, toxina se evidenţiază în colon, dar nu în ser.

Tratament. Serul imun trivalent faţă de cele 3 serotipuri de toxină botulinică (A, B, E) se obţine pe cal şi se administrează imediat, intravenos. Rata mortalităţii s-a redus semnificativ.

C. tetani este un bacil mobil prin flageli, răspândit în sol şi în materialele fecale ale animalelor, în special de cal. Celulele vegetative ale tuturor tulpinilor izolate au antigen somatic O comun şi toate produc acelaşi tip antigenic de neurotoxină, *tetanospasmina*.

Ca şi *C. botulinum, C. tetani* nu este invaziv. Infecţia rămâne strict localizată în aria de ţesut devitalizat (răni, arsuri, suturi chirurgicale, resturi de cordon ombilical) contaminate cu spori din mediul extern. Sporii germinează în ţesutul devitalizat la un potenţial redox de +10 mV (potenţialul redox al ţesutului normal este de +120 mV), iar celulele vegetative sintetizează *tetanospasmina* pe care o eliberează prin autoliză. Infecţia localizată este adeseori nesemnificativă clinic. Toxina se răspândeşte prin filetele nervoase, în neuronii din măduvă şi trunchiul cerebral, prin transport axonal retrograd.

Perioada de incubaţie este de la 4–5 zile, până la mai multe săptămâni. Boala este o *toxemie* şi constă în paralizia muşchilor striaţi în stare de *contracţie tetanică*. Traumele severe creează condiţii predispozante pentru tetanos, dar peste 50% din cazuri sunt consecutive leziunilor minore. Moartea este consecinţa paraliziei muşchilor respiratori. Rata mortalităţii este foarte înaltă.

Tetanosul este o boală care se poate preveni integral prin administrarea vaccinului reprezentat de *anatoxina tetanică* (toxina detoxifiată sub acţiunea formolului), adsorbită pe săruri de aluminiu (hidroxid de Al, fosfat de Al), cu rol de adjuvanţi.

Cl. botulinum. Sporii din mediul extern ajung în alimentele conservate cu nivel scăzut al O_2. Sporii germinează şi celulele vegetative produc toxina. Toxina este termolabilă, astfel că alimentele tratate termic nu transmit botulismul. Toxina preformată este ingerată, se absoarbe la nivel intestinal şi acţionează asupra terminaţiilor nervoase periferice. Efectul este inhibiţia eliberării mediatorului sinapselor colinergice şi *paralizia flască* a muşchilor striaţi.

Structura. Neurotoxinele botulinice şi tetanospasmina sunt sintetizate ca polipeptide unice, clivate de proteaze bacteriene în cele 2 subunităţi, de 50 respectiv 100 kDa, dar rămân legate printr-o punte S-S.

Mecanismul de acţiune este *proteolitic*, comun, atât pentru toxina botulinică, cât şi pentru tetanospasmină. Indiferent de modul în care toxina botulinică dobândeşte acces în organism (ingestia toxinei preformate sau producerea ei într-o rană sau în tractul gastrointestinal), *mecanismul de acţiune este identic*. Toxina se leagă de receptorii terminaţiilor nervoase periferice şi este internalizată printr-un mecanism necunoscut (fig. 228). Subunitatea mică a toxinei botulinice este litică pentru proteinele neuronale ţintă SNARE (sinaptobrevina, SNAP 25 şi sintaxina (Brooks şi colab., 2007) şi blochează eliberarea acetilcolinei la nivelul sinapsei, efectul fiind absenţa contracţiei şi *paralizia flască* a muşchilor striaţi.

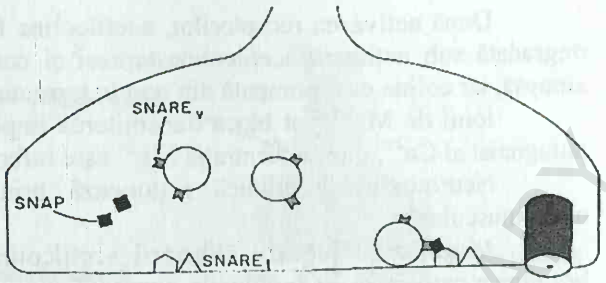


Fig. 228. Reprezentarea componentelor butonului presinaptic: SNAP = proteină asociată sinaptosomului; SNAREv = vezicule cu mediatori sinaptici; SNARE = receptori ai membranei presinaptice; cilindrul reprezintă canalul de Ca.

Toxina botulinică se deosebeşte de tetanospasmină, prin aceea că acţionează *periferic*: se fixează la nivelul sinapselor neuroefectoare şi blochează transmiterea impulsului (fig. 229), producând *paralizia flască* a muşchilor dependenţi de sistemul nervos vegetativ, care interferă cu respiraţia şi produc asfixia. Toxina acţionează specific asupra sistemului nervos periferic. SNC nu pare să fie afectat, probabil datorită barierei sânge-creier sau datorită lipsei receptorilor pentru toxină.

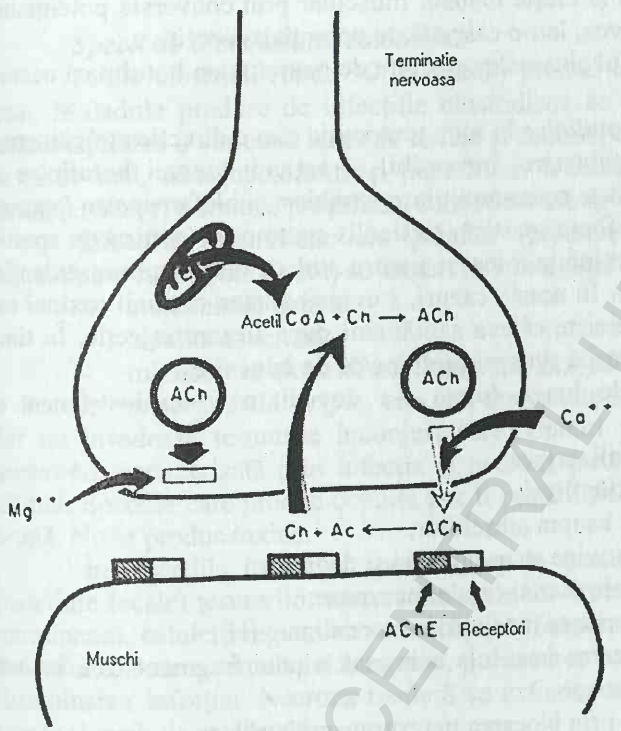
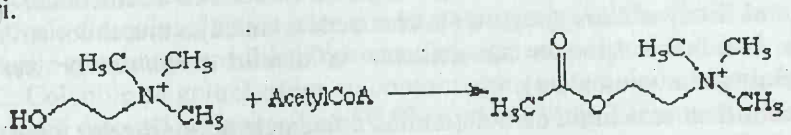


Fig. 229. Ilustrarea schematică a metabolismului acetilcolinei la joncţiunea neuromusculară.

Toxina botulinică se leagă specific la joncţiunea neuro-musculară şi produce paralizia completă a fibrelor nervoase colinergice. Acetilcolina este mediatorul următoarelor trei tipuri de fibre: terminaţiile fibrelor preganglionare simpatice şi parasimpatice; terminaţiile postganglionare parasimpatice; terminaţiile ce inervează muşchii striaţi. Toxina botulinică pare să paralizeze numai sinapsele care au ca mediator acetilcolina.

Acetilcolina este sintetizată în terminaţia nervoasă presinaptică, din acetatul derivat din acetil-coenzima A şi colina de origine alimentară. Legarea lor este catalizată de colin-acetiltransferază. După sinteză, acetilcolina este depozitată în vezicule. Impulsul nervos induce influxul Ca^{2+} şi efluxul veziculelor cu acetilcolină. Acetilcolina este eliberată prin procese de exocitoză în fanta sinaptică şi se leagă de receptori.



Colina Acetilcolina

După activarea receptorilor, acetilcolina fie difuzează spre membrana post-sinaptică, fie este degradată sub acțiunea acetilcolinesterazei și convertită la acetat și colină. Acetatul difuzează din sinapsă, iar colina este pompată din nou în terminația presinaptică pentru reutilizare.

Ionii de Mg^{2+} pot bloca transmiterea impulsului la sinapsa colinergică, deoarece Mg este un antagonist al Ca^{2+}, dar concentrația Mg^{2+} este inferioară și transmiterea nu este blocată.

Neurotoxina botulinică acționează prin *blocarea eliberării acetilcolinei* la joncțiunea neuromusculară.

Mecanismul blocării eliberării acetilcolinei s-a elucidat recent: porțiunea activă a toxinei botulinice care intră în terminația nervoasă are activitate *peptidazică* specifică pentru proteinele ce formează structurile *veziculare* ce conțin mediatorul sinaptic (acetilcolina) și au rol în exocitoză. Acțiunea toxinei împiedică exocitoza mediatorului sinaptic și propagarea potențialului de acțiune.

Perioada de incubație este dependentă de doză: câteva ore până la câteva zile, după care apar dificultăți ale actului deglutiției și respirației, diplopie, paralizia extremităților. Rata mortalității este mare. Pacienții care se recuperează nu sintetizează anticorpi specifici anti-toxină.

Antiserul specific administrat timpuriu, înainte ca toxina botulinică să se fixeze pe receptorii țesutului nervos, se folosește în scop terapeutic. *Guanidina*, administrată în scop terapeutic, acționează presinaptic și stimulează eliberarea acetilcolinei din terminațiile nervoase, iar monoacetatul germinal (din semințe încolțite) acționează postsinaptic și crește tonusul muscular prin conversia potențialului unic de acțiune cauzat de un singur impuls nervos, într-o cascadă de potențiale repetitive.

Recuperarea funcției nervoase la nivelul sinapselor afectate de neurotoxina botulinică necesită formarea unor noi plăci neuromotorii.

Utilizarea acțiunii selective a toxinei botulinice în scop terapeutic este o direcție atrăgătoare de investigație farmacologică. Specificitatea și caracterul ireversibil al acțiunii toxinei botulinice s-a folosit cu succes pentru tratamentul unor afecțiuni neuromusculare: strabism și blefarospasm (spasmul mușchilor pleoapelor), spasmul hemifacial, disfonia spastică, torticolis spasmodic (contracția spastică a mușchilor gâtului). Cantități foarte mici de toxină se folosesc pentru a bloca răspunsul muscular față de impulsurile nervoase care produc disfuncții. În aceste cazuri, ireversibilitatea acțiunii toxinei este ideală, deoarece efectul terapeutic poate să persiste câteva săptămâni după fiecare injecție. În timp, efectele terapeutice ale toxinei sunt anulate, datorită sintezei proteinelor de înlocuire.

Toxina botulinică, datorită acțiunii de lungă durată s-a dovedit a fi un instrument de investigație în trei domenii de cercetare:

- localizarea terminațiilor nervoase colinergice;
- studiul mecanismului eliberării acetilcolinei;
- analiza efectelor trofice ale nervilor asupra mușchilor.

Mecanismele de acțiune ale celor două toxine au asemănări și deosebiri:

- ambele se leagă pe un receptor membranar al celulei nervoase;
- legarea celor două toxine de receptori este mediată de catena mare (H);
- treapta paralitică necesită internalizarea în celula nervoasă a unui fragment care include catena ușoară sau o secvență a acesteia;
- ambele produc disfuncții musculare prin blocarea neurotransmițătorilor;
- toxina tetanică acționează la nivelul *centrilor nervoși* din măduva spinării și din trunchiul cerebral. Se leagă de receptorii de pe membrana sinaptică a neuronilor somatomotori și migrează în pericarionii din măduva spinală și din trunchiul cerebral, prin transportul axonal retrograd. Toxina difuzează spre prelungirile *celulelor inhibitorii ale transmiterii potențialului de acțiune*: neuronii de asociație ai căror mediatori sinaptici sunt *glicina și acidul gama-aminobutiric* (GABA). Toxina tetanică degradează sinaptobrevina, proteina care mediază legarea veziculelor cu mediatori de membrana presinaptică a neuronilor inhibitori. În absența mediatorilor inhibitori, eliberarea acetilcolinei este necontrolată, rezultatul fiind *paralizia spastică* (în contracție tetanică) a mușchilor striați;
- toxina botulinică își exercită acțiunea la nivelul *terminațiilor nervoase periferice* (joncțiunea neuromusculară);

Nu s-au identificat structurile care determină diferențele acțiunii celor două toxine (fig. 230). Omologia aminoacizilor în cele două catene ale celor două toxine este remarcabilă. Se consideră că genele codificatoare au evoluat dintr-o genă ancestrală comună.

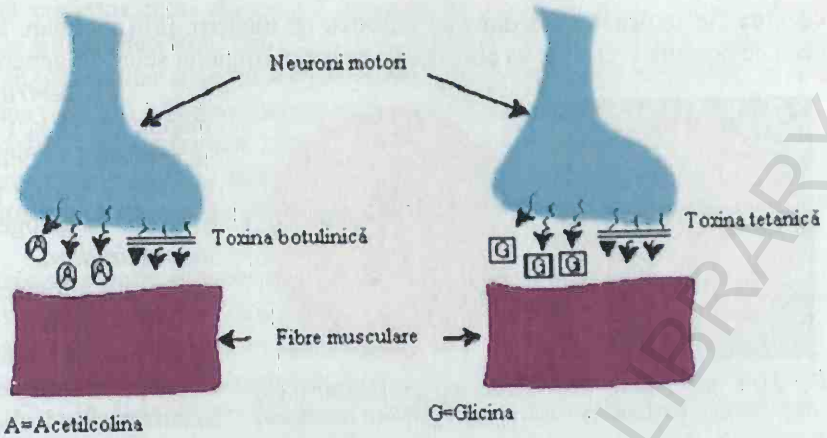


Fig. 230. Prezentarea schematică comparativă a modului de acțiune a toxinelor botulinice și tetanică. Toxina botulinică blochează eliberarea acetilcolinei din butonul presinaptic și produce paralizia flască, iar toxina tetanică blochează eliberarea GABA, mediatorul inhibitor al propagării impulsurilor la nivelul sinapsei și produce paralizia spastică.

Toxina tetanică și cea botulinică de tip G sunt codificate de gene plasmidiale; toxinele C și D botulinice sunt codificate de gene fagice.

Specii de Clostridium histotoxice

Multe clostridii (circa 30 de specii) produc infecții invazive dacă sunt inoculate în țesutul lezat. Maladiile produse de infecțiile clostridiene se datorează producerii *exotoxinelor*. Clostridiile invazive produc o varietate largă de toxine și enzime, care favorizează diseminarea infecției. Toxinele au efect letal, fiind necrozante și hemolitice. Uneori, efectele sunt produse de entități moleculare distincte, alteori diferitele proprietăți sunt cumulate de aceeași moleculă.

Infecțiile clostridiene ale plăgilor (produse prin leziuni tisulare mecanice profunde și contaminate cu granule de sol) se împart în 3 categorii:

- contaminări simple
- celulita anaerobă
- mionecroza clostridiană (gangrena gazoasă).

În *contaminările simple*, una sau mai multe specii de *Clostridium* se găsesc în țesutul lezat, dar nu invadează țesuturile înconjurătoare. Uneori progresează la condiția patologică de *celulită anaerobă*, caracterizată prin infecția și necroza țesutului traumatizat, fără ca țesutul sănătos să fie afectat. Speciile care produc celulita pot fi proteolitice și din această cauză, rana poate avea culoarea brună. Nu se produc toxine.

În infecțiile invazive, sporii ajung în țesuturi fie prin contaminarea (cu granule de sol, materiale fecale) țesuturilor traumatizate, fie din tractul intestinal. La potențialul redox scăzut, sporii germinează, celulele vegetative se multiplică, fermentează glucidele tisulare și produc gaze. Distensia țesutului, blocarea circulației sanguine, producerea toxinelor necrozante și hialuronidazei favorizează diseminarea infecției. Necroza tisulară se extinde, anemia hemolitică progresează, nivelul toxemiei crește și evoluția este letală.

Mionecroza (gangrena gazoasă) implică invazia mușchiului sănătos, care nu fusese avariat de traumă sau de ischemie. În stadiul terminal se instalează starea de prostrație, apatie, șocul ireversibil. Probabil, moartea se datorează intoxicației cronice și efectului direct al toxinelor asupra organelor vitale. Cele mai multe mionecroze sunt produse de *C. perfringens*, *C. novyi* și *C. septicum*. Nici una dintre specii nu este foarte invazivă. De fapt aceste specii sunt saprobionte, dar produc toxine necrozante, *lecitinazice* și *hemolitice*. În leziunile mionecrotice infecția este întotdeauna mixtă, cu clostridii toxigene, proteolitice, diferiți coci și bacterii Gram negative.

Cel mai comun invaziv este *C. perfringens* (denumirea veche – *C. welchii*), component al *microbiotei* intestinale a omului și animalelor și a tractului genital la 5% dintre femei. Sporii sunt rari și nu apar în culturile crescute pe mediile obișnuite. Crește la temperaturi cuprinse între 20 și 50°C, cu un optim la 45°C. Coloniile pe geloză-sânge au contur dublu: o zonă clară internă datorată toxinei θ și o zonă externă neclară datorată toxinei α (testul CAMP pozitiv) (fig. 231).

Este un bacil imobil, reduce nitratul, fermentează glucoza, lactoza, manoza, sucroza etc. și lichefiază gelatina. Lactoza din lapte este fermentată cu coagulare și producere de gaz, dar nu digeră

cazeina. Se izolează uşor dintr-un amestec de bacterii, prin incubare la 45°C (t° optimă de creştere), ceea ce permite creşterea sa abundentă, datorită timpului scurt de generaţie (8 min).

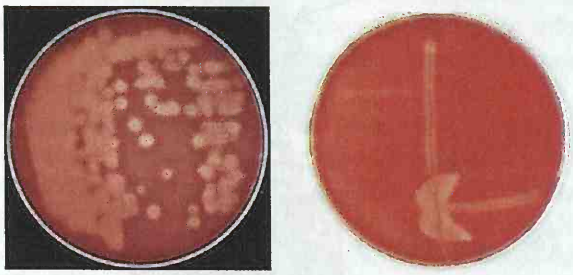


Fig. 231. C. perfringens – hemoliza dublă şi testul CAMP pozitiv (http://www.graphicshunt.com/health/images/ clostridium_perfringens).

C. perfringens produce 4 toxine letale majore (α, β, ε, ι (iota)), pe baza cărora speciile se grupează în cele 5 tipuri toxigene: A, B, C, D, E. Alte 9 toxine minore (antigene solubile) pot avea rol în patogeneză: δ, θ, k, λ, μ, ν, γ, eta şi *neuraminidaza*. *Enterotoxina* poate cauza intoxicaţii alimentare.

Cele mai importante pentru infecţiile de plagă sunt tulpinile *grupului A*, prezente în sol şi în conţinutul intestinal uman şi animal, în absenţa manifestărilor clinice. Ele produc toxina α (fosfolipază C), *k* (colagenază), θ (hemolizină), λ (protează) şi ν (*nu*) (DN-ază). Tipurile B, C, D, E nu supravieţuiesc în sol şi par a fi obligat parazite. Se găsesc în tractul intestinal al animalelor domestice, iar prezenţa acestor tipuri la om este asociată cu boala.

Cea mai importantă toxină produsă de tulpinile A de *C. perfringens* este *toxina* α. Este o *fosfolipază C* (o lecitinază dependentă de Ca), o metaloprotează cu Zn, de 53 kDa, ce hidrolizează lecitina, componentă majoră a membranei citoplasmatice şi de asemenea, complexele fosfolipidice sanguine, eliberând fosforil-colină şi digliceride. α-toxina determină reacţia pozitivă pentru lecitinază pe mediul cu gălbenuş de ou şi produce o hemoliză incompletă pe geloză-sânge.

In vivo, *α-toxina* produce hemoliza intravasculară, agregare plachetară, leziuni capilare, liza leucocitelor, hipotensiune şi bradicardie, rezultatul final fiind adeseori şocul toxic. Ionii de Ca, care condiţionează activitatea fosfolipazei C, pot avea rolul de a conferi sarcină pozitivă miceliilor de lecitină. Activitatea toxinei este inhibată de fosfat sau de alte substanţe care leagă Ca. Activităţile hemolitică şi hidrolitică ale fosfolipazei C s-au disociat prin încălzire la 56°C, în prezenţa ionilor de Ca. Activitatea hemolitică este inhibată, iar cea hidrolitică se păstrează. Este factorul major al mionecrozei (gangrena gazoasă).

Toxina-β este o toxină letală majoră produsă de tulpinile B şi C de *C. perfringens*, responsabilă de leziunile enteritei necrotice la pacienţii cu un nivel scăzut al dietei proteice. Pacienţii au nivel scăzut al activităţii proteazelor digestive, acestea fiind blocate de inhibitorii din cartoful consumat tradiţional în cantităţi mari la sărbătorile din Noua Guinee, împreună cu carnea de porc cu rol de sursă a agentului infecţios.

Toxina-ε este produsă de tulpinile de tip B şi D. Este sintetizată ca o protoxină cu toxicitate minimă, convertită la forma de peste 1000 de ori mai activă după clivarea proteolitică a secvenţei N-terminale, sub acţiunea proteazelor bacteriene sau a tripsinei. Protoxina conţine 311 aminoacizi. Activarea protoxinei corespunde ruperii legăturii peptidice între aminoacizii 14–15 de la capătul N şi eliberarea "peptidului de activare" de 14 aminoacizi.

Toxina lezează în primul rând intestinul, producând creşterea permeabilităţii peretelui intestinal, cu creşterea înglobării toxinei, care acţionează sistemic şi îşi exercită efecte letale. După intrarea în circulaţie produce hiperemie renală, edem pulmonar, exces de lichid pericardic.

Toxina iota este sintetizată de tulpinile E de *C. perfringens* izolate din intestinul de viţel cu semnele enteritei şi ale intoxicaţiei generale. Este alcătuită din două proteine, distincte biologic şi imunologic (iota-a şi iota-b). Activitatea toxică este produsă de amestecul celor două proteine. Iota-b are rol de legare, iar iota-a pătrunde în citosolul celulelor sensibile: actina globulară a muşchilor striaţi şi actina nemusculară sunt ADP-ribozilate. Este dermonecrotică şi letală pentru şoarece.

C. perfringens poate produce *enterotoxemia** la om şi animale, după ingestia unui număr mare de celule vii sau după ingestia alimentelor contaminate. Se multiplică în intestin şi enterotoxina atinge repede un nivel suficient de crescut pentru a fi absorbită în sânge. Enterotoxemia este produsă de enterotoxine, β-toxină şi toxina ε. Ultima măreşte permeabilitatea intestinală, ceea ce permite absorbţia rapidă a toxinei din lumen. Are afinitate mare pentru ţesutul nervos şi rinichi, unde produce edem şi necroză.

* Enterotoxemia este consecutivă creşterii accentuate a permeabilităţii barierei intestinale, consecinţa fiind tranzitul unei cantităţi crescute de toxine, din lumen, în mediul intern.

Enterotoxemia asociată cu intoxicația alimentară produsă de *C. perfringens* are un caracter particular, deoarece toxina nu se sintetizează în timpul creşterii vegetative, ci numai în timpul sporulării. Toxina se acumulează în sporangiul celular şi se eliberează numai după liza celulei vegetative şi după eliberarea sporului matur. Toxina pare a fi o proteină structurală a învelişului sporal.

În cele mai multe cazuri de intoxicații alimentare, se consideră că celulele vii de *C. perfringens* sunt ingerate odată cu alimentele, ajung în intestin, sporulează şi se lizează eliberând enterotoxina. Argumentul major împotriva toxinei preformate este că, în produsele alimentare, bacteria sporulează puțin sau deloc.

Tulpinile de *C. perfringens* care sintetizează toxina β în cantitate mare sunt asociate cu *enterita necrozantă.* Toxina produce paralizia locală a mişcărilor intestinale, urmată de inflamație, hemoragie, necroză gangrenoasă focală, în special în jejun.

Enterotoxina (CPE) este o proteină oligomerică de 35 kDa, cu punctul izoelectric la pH 4,3, produsă de tulpinile de tip A, C şi D. Este un peptid cu 309 amioacizi, cu un grup sulfhidril liber. În anumite condiții CPE formează un complex de cca 155 kDa, care ar corespunde unui por ce alterează permeabilitatea membranei. Activitatea enterotoxinei creşte de câteva ori după tratamentul cu tripsină. Tripsina clivează toxina, la două situsuri, fiecare cu un rest de lizină, rezultând două peptide de 15 şi respectiv de 10 aminoacizi. Toxina tripsinizată constă dintr-o catenă de 284 de aminoacizi şi cele două peptide asociate, care nu se separă de catena majoră decât în prezența SDS. Aminoacizii din regiunea 45–116 sunt esențiali pentru activitatea toxinei, mediind interacțiunea acesteia cu ocludina, o proteină de 65 kDa situată la nvielul joncțiunilor strânse. Receptorii sunt necunoscuți.

Modul de acțiune a enterotoxinei de *C. perfringens* este asemănător cu al enterotoxinei holerice şi al enterotoxinei β de *Staphylococcus* sp.: produce creşterea permeabilității capilarelor, vasodilatație şi creşterea motilității intestinale.

Enterotoxina se leagă de receptorii de suprafață ai celulelor epiteliale intestinale. Legarea este urmată de inserția întregii molecule în membrană, fără internalizare. Se produce o schimbare bruscă a fluxului ionic, care influențează metabolismul şi sinteza macromoleculelor, creşte nivelul Ca^{2+} intracelular, iar transportul apei, Na şi Cl este inversat, de la absorbție spre secreție. Se pierde lichidul celular, ionii şi moleculele de până la 3,5 kDa. Toxina are activitate maximă în ileon, moderată în jejun şi este inactivă în duoden.

În infecțiile cu *C. perfringens*, rolul fundamental în patogeneză îl are *fosfolipaza C.* Colagenaza, proteaza nespecifică, hemolizina şi DN-aza produc modificări ale țesutului infectat. Acțiunea toxinelor produce *edemul*, care diminuează fluxul sanguin şi potențialul redox al țesutului, urmat de necroză. Aceste modificări uşurează creşterea agentului infecțios şi răspândirea infecției în țesutul înconjurător.

Neuraminidaza (sialidaza) este un factor de patogenitate al multor microorganisme. Acțiunea sa asupra eritrocitelor le face aglutinabile, creşte vâscozitatea sângelui şi favorizează tromboza capilară. Este formată dintr-un singur lanț polipeptidic de 64 kDa. La isoelectrofocusare se relevă 5 componente, fiecare cu pH izoelectric distinct. După denaturare cu SDS sau uree 8M, diferențele dispar şi polipeptidul are pH izoelectric la 4,3.

Pentru *diagnostic*, se analizează materialele din leziune: puroi, țesut necrozat. Prezența bacililor mari Gram pozitivi sugerează clostridiile gangrenei gazoase. Sporii nu sunt întotdeauna prezenți. Materialul din leziune se inoculează pe mediul *chopped meat*-glucoză cu tioglicolat (pentru anaerobi) şi pe plăci cu geloză-sânge. Cultura se transferă în mediu cu lapte. Coagularea cu producere intensă de gaz în 24 ore este revelatoare pentru *C. perfringens* (232).

Fig. 232. Aspectul culturii de 48 de ore de *C. perfringens* pe mediu cu gălbenuş de ou (Nagler). Apariția precipitatului indică activitatea lecitinazică (http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Clostridium perfringens).

Identificarea finală constă în evidenţierea toxinei şi neutralizarea ei în prezenţa anticorpilor specifici.

C. novyi (*C. oedematiens*) se întâlneşte cu o frecvenţă de 40–60% în rănile infectate şi este asociat cu gangrena gazoasă. În funcţie de capacitatea de a produce diferite toxine, tulpinile sale aparţin la 3 grupe toxigenice: A, B, C.

Cele două specii produc toxine, unele cu specificităţi antigenice comune, neputând fi distinse pe baze serologice.

C. septicum produce o maladie a oilor denumită *braxy**, caracterizată prin infecţia mucoasei şi a submucoasei abomasum, multiplicare cu bacteriemie şi toxemie fatală în câteva ore de la apariţia simptomelor.

* Braxy este o maladie acută, de obicei fatală, a mieilor şi oilor tinere, ale cărei simptome sunt febra, anorexia, inflamaţia peretelui abomasum şi toxemia. Maladia apare numai iarna şi se poate datora invaziei abomasum cu *Cl. septicum*. Ingestia vegetalelor îngheţate este un posibil factor predispozant. Moartea survine în câteva ore de la apariţia simptomelor.

C. histolyticum este o bacterie comună în sol, rareori asociată cu gangrena gazoasă în etiologie unică, dar care poate fi implicată în asociaţie cu *C. perfringens* în etiologia gangrenei gazoase. Produce colagenaze şi alte enzime proteolitice, unice prin eficienţa lor de a hidroliza proteinele tisulare până la peptide şi aminoacizi. Frecvenţa redusă a izolării s-ar putea datora dificultăţilor de cultivare. Nu este strict anaerob (creşte pe mediile agarizate chiar în prezenţa aerului), dar este inhibat de glucoza din mediu, iar rezistenţa termică a sporilor este redusă. Nu fermentează glucidele, dar este proteolitic. Nu formează alţi acizi, cu excepţia acidului acetic.

C. histolyticum produce cel puţin 5 toxine-enzime:

- α-*toxina* necrozantă şi letală produce moartea animalelor în 24 de ore de la injecţia intramusculară. Tegumentul şi muşchii adiacenţi zonei injectate sunt complet lizate;
- β-*toxina* are efecte colagenazice. Este o metaloprotează care clivează colagenul nativ triplu-helix şi gelatina. Pe baza proprietăţilor fizice s-au identificat 7 variante de colagenaze;
- γ-*toxina*, o protează activată de gruparea tiol, ce digeră gelatina, cazeina, dar este inactivă faţă de colagen;
- δ-*toxina*, o enzimă proteolitică cu activitate elastazică, inactivată reversibil în prezenţa agenţilor reducători;
- ε-*toxina*, o hemolizină labilă la O_2, asemănătoare serologic cu cele produse de alte clostridii.

C. difficile este un component al *microbiotei normale a intestinului* la copii şi la un procent mic de adulţi. Lichefiază gelatina, dar nu este proteolitic. Fermentează fructoza, glucoza, manitolul, manoza şi xiloza. Este negativ pentru lecitinază şi lipază şi produce un amestec de acizi (acetic, butiric, izobutiric, valeric, izovaleric, izocaproic, formic şi lactic în mediul cu extract de levuri şi glucoză).

Iniţial s-a izolat dintr-o *colită pseudomembranoasă* (PMC) umană post-tratament cu antibiotice, ulterior maladia fiind reprodusă la hamster, cobai, iepure, după administrarea antibioticelor. Microbiota bacteriană normală este bariera majoră protectoare faţă de colonizarea cu agenţi patogeni. Dacă microbiota este perturbată, gazda devine sensibilă la colonizare cu specii alohtone sau la multiplicarea masivă a unor specii indigene condiţionat-patogene. Utilizarea antibioticelor creează condiţii predispozante la PMC, deoarece inhibă dezvoltarea microbiotei normale, cu apariţia unui dezechilibru numeric al speciilor componente, stare denumită *disbioză*. Orice antibiotic poate induce PMC, dar clindamicina are cel mai înalt potenţial.

C. difficile este toxigen *in vitro* şi *in vivo* şi produce două toxine cu potenţial letal: o *enterotoxină* (toxina A – de 400–600 kDa) şi o *citotoxină* (toxina B – de 360–500 kDa). Ambele determină efecte letale după injectare subcutanată sau intramusculară la şoarece, hamster şi maimuţa rhesus, iar *in vitro* determină efecte citopatice asupra celulelor animale şi umane. Cele două toxine se găsesc în supernatantul culturilor de *C. difficile*.

Toxina A se leagă de gangliozidul GM_1 al bordurii în perie a enterocitului şi este la fel de activă ca şi toxina holerică. Toxina B are acţiune predominant citotoxică şi este mai puternică decât toxina A. Ambele toxine se găsesc în scaunul pacienţilor cu PMC.

Diagnosticul infecţiei cu *C. difficile* se pune după detectarea uneia sau ambelor toxine în scaun şi prin observarea endoscopică a pseudomembranelor sau a microabceselor mucoasei colonului la pacienţii cu diaree post tratament cu antibiotice, în special cu ampicilină şi clindamicină.

Diareea asociată cu antibioticele este moderată, mai uşoară decât PMC şi datorată disbiozei intestinale, în care predomină *C. difficile*.

Bibliografie selectivă

1. Brook I. 2008. Anaerobic Infections Diagnosis and Management. Ed. Informa Healtheare USA, pp. 1–17
2. Dixon T. C., Meseslson M., Guilemin J. et al. 1999. Anthrax. N Engl J Med 341: 815–826
3. http://microbiology2009.wikispaces.com/file/view/clostridium_tetani.gif http://www.eol.org/pages/Clostridium_septicum
4. http://sitemaker.umich.edu/mc5/files/clostridium_difficile.jpg
5. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0f/Clostridium_difficile_01.png
6. http://www.graphicshunt.com/health/images/clostridium_perfringens
7. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english
8. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showmorf
9. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showmorf.asp?articleid=2
10. http://www.millennium-ark.net/NEWS/08_Health/08_Health_pics/081201.clostridium.jpg)
11. http://www.millennium-ark.net/NEWS/08_Health/08_Health_pics/081201.clostridium.jpg
12. http://www.path.cam.ac.uk/partIB_pract/P27/P27_08-09v01asc.htm
13. http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Clostridium+perfringens.
14. McBride B. W., Turnbull P. Cb. 1999. *Bacillus*, Infection and Immunity 1: 311 Ed. P. Delves, Ivan M. Roitt, Academic Press.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9. BACILI GRAM POZITIVI NESPORULAŢI

În cadrul acestui grup sunt incluse speciile genului *Corynebacterium* şi cele anaerobe, aparţinând genului echivalent *Propionibacterium* (care va fi tratat la capitolul dedicat infecţiilor anaerobe), componente ale microbiotei umane normale cutanate şi asociate mucoaselor. *Corynebacterium diphtheriae*, agentul difteriei este cel mai important membru al grupului pentru patologia umană. *Listeria monocytogenes* şi *Erysipelothrix rhusiopathiae* sunt patogeni la specii animale, dar ocazional pot produce boli grave la om.

9.1. Genul Corynebacterium

În prezent, boala difterică este practic eradicată, cazuri sporadice apărând în colectivităţi de copii nevaccinaţi (în ţara noastră, 1–2 cazuri/an). Maladia difterică este gravă, cu mortalitate rapidă în 24–48 de ore sau supravieţuire cu sechele grave.

Denumirea de *Corynebacterium* a fost dată de Lehman şi Newman în 1896 unor bacili Gram pozitivi, drepţi sau curbaţi, frecvent cu aspect măciucat, colorați neomogen datorită incluziilor de polifosfat, grupaţi după unghiuri ascuţite sau palisade. Frecvent apar forme ovoide sau cocoide (fig. 232). Celulele sunt imobile, nesporulate şi necapsulate.

Fig. 236. C. diphteriae. Morfologia celulelor pe frotiul colorat Gram (x 1000, x 1200, x 1500)
(http://www.sciencephotolibrary.com/images/showFullWatermarked.html/B220081-LM_of_Corynebacterium_diphtheria_bacteria-SPL.jpg, http://www.thefullwiki.org/Corynebacterium_diphtheriae, http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/tracto-respiratorio-superior2.shtml).

În structura peretelui celular se găseşte *acidul* mezodiaminopimelic, *polizaharidul* alcătuit din arabinoză, galactoză şi manoză şi *acidul micolic* cu catenă de 22-36 atomi de C. Polizaharidul şi acizii micolici îi conferă proprietatea de acido-alcoolo-rezistenţă.

Genul *Corynebacterium* se înrudeşte cu *Mycobacterium* şi cu *Nocardia*, datorită structurii peretelui, deosebirea făcându-se după tipul de peptidoglican şi după lungimea catenei de C din acizii micolici.

Speciile de *Corynebacterium* nu produc hemolizine, sunt catalazo-pozitive, iar unele specii patogene produc toxine.

Genul *Corynebacterium* cuprinde la ora actuală peste 80 de specii, care se deosebesc prin caracterele biochimice: hidroliza esculinei, lichefierea gelatinei etc.

După habitat şi patogenitate, speciile de *Corynebacterium* se clasifică în următoarele categorii:
- specii patogene pentru om şi animale;
- specii patogene pentru plante;
- specii nepatogene.

C. diphteriae este agentul cauzal al difteriei, *C. minutisimum* produce o dermatoză a pielii, *C. mycetoides* este agentul patogen al ulcerelor tropicale la om, iar *C. urealyticum* este agent al infecțiilor urinare.

C. ulcerans este patogen al bovinelor, dar poate produce la om faringită exudativă sau ulcere ale tegumentului mâinii; *C. ovis* poate să determine limfadenita granulomatoasă acută sau pneumopatii cu eozinofile la om.

Corinebacteriile nepatogene sunt asemănătoare cu cele patogene (difteromorfe), Gram pozitive sau Gram variabile, cu același mod de grupare și pot produce infecții oportuniste. *C. hofmani*, component al microbiotei normale a bucofaringelui, poate produce infecții ale tractului urinar la pacienții cu transplant renal sau endocardită post-chirurgie valvulară.

Corinebacteriile grupului J. K se dezvoltă pe tegument și în 25–30% dintre cazuri constituie agentul cauzal al infecțiilor intraspitalicești.

Conceptul bolii difterice datează din antichitate (boala gâtului transmisibilă la copii), iar cel modern a fost formulat de Bretoneau (1821), care a dat denumirea de *difterită* și ulterior de *difterie*.

Klebs a descoperit agentul patogen în pseudomembrane, iar Loeffler l-a cultivat pe serul de bou coagulat. Roux a confirmat că filtratul de cultură determină leziuni asemănătoare cu cele produse de infecție.

Difteria este o *toxemie*. Behring și Kitasato au modificat toxina și au obținut serul imun antitoxină prin imunizarea calului. Ramon (1929) a inactivat toxina sub acțiunea formolului și a căldurii și a obținut anatoxina diftерică, utilizată ca vaccin. În 1931, *C. diphteriae* s-a clasificat în tipuri: *gravis, mitis* și *intermedius*. În 1951, Freeman a descoperit fenomenul *conversiei* tulpinilor netoxigene în variante toxigene, prin lizogenizare. Straus și Hende (1959) consideră că toxina diftерică acționează prin blocarea sintezei proteinelor în celulele sensibile, iar Pappenheimer (1970) a descoperit structura toxinei difterice.

C. diphteriae este localizat în tractul respirator, răni sau pe tegumentul persoanelor infectate și al purtătorilor normali. Este diseminat prin contact direct la persoanele sensibile. Bacilii rămân la poarta de intrare, fie în pseudomembranele faringiene (fig. 234), fie în secreția oculară (în cazul infecției oculare), în secreția vulvară (difteria vaginală) sau în ulcerele profunde ale pielii în difteria cutanată specifică pentru zonele calde.

C. diphteriae se găsește la câine, pisică, purtătorii naturali, fără să determine îmbolnăviri.

Tulpinile lizogenizate cu un fag sunt toxigene. Genomul fagului temperat determină două fenomene importante: *lizogenia* și *toxigeneza*. Unii fagi sunt tox^+, iar alții sunt tox^-. Dacă genomul fagic poartă gena *tox*, celulele de *C. diphteriae* sintetizează toxina.

Bacilul difteric rezistă 10 minute la 60°C, dar este mult mai rezistent la uscăciune și întuneric; rezistă 15 zile în lapte și luni de zile pe obiectele infectate cu păstrarea patogenității. Este foarte sensibil la antibioticele uzuale: eritromicină, penicilină, mai puțin sensibil la oxacilină și rareori apar tulpini rezistente la tetraciclină, dar este distrus de antisepticele uzuale.

C. diphteriae este o bacterie aerobă facultativ anaerobă, care se dezvoltă pe medii simple, cu adaos de ser de bou și eventual, de ou. Temperatura de dezvoltare este de 15–40°C, cu optimum la 37°C. Sinteza maximă de toxină este la 35°C.

Toate speciile fermentează glucoza, dar nu fermentează zaharoza. *C. diphteriae*, *C. ulcerans* și *C. ovis* produc *cistinaza*, enzima care hidrolizează cistina cu eliberarea H_2S (fig. 235). Corinebacteriile difteromorfe nu produc cistinază.

Fig. 234. Pseudomembrane în infecția diftерică (http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/tracto-respiratorio-superior2.shtml).

Fig. 235. Aspectul caracteristic al coloniilor negre formate de *C. diphteriae* pe mediu cu cistină și telurit (Tinsdale modificat) (http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/Image26014.gif)

C. diphteriae nu produce urează, ceea ce diferenţiază această specie de *C. ulcerans* şi *C. ovis*, specii pozitive pentru testul ureazei. La difteromorfi, testul ureazei este variabil.

Toxina difterică

Difteria este produsă de tulpinile de *C. diphteriae* lizogenizate cu un fag *tox*$^+$ şi se manifestă local la nivel faringo-amigdalian, cu alterarea necrotică a mucoasei. Procesul infecţios este asociat cu exsudat inflamator şi formarea pseudomembranelor alb-cenuşii, aderente de mucoase şi cu procese hemoragice. Membranele pot invada faringele şi produc senzaţia de sufocare. Ganglionii regionali cresc în volum, apare starea febrilă şi senzaţia de rău general. În formele hipertoxice pot apărea manifestări hemoragice plurifocale şi fenomenul de miocardită, datorită tropismului toxinei pentru miocard, sau paralizii de văl palatin şi de diafragmă, datorită tropismului toxinei pentru ţesutul nervos.

Difteria este o infecţie localizată a tractului respirator superior produsă de *C. diphteriae*, a cărui virulenţă este determinată în exclusivitate de secreţia *toxinei difterice*. Exotoxina este eliberată în focarul primar al infecţiei, ajunge în mediul intern şi produce efecte sistemice: degenerarea parenchimatoasă şi depozitarea lipidelor în ficat, necroza muşchiului cardiac, a ficatului, rinichiului, corticosuprarenalelor, uneori cu hemoragii ample. În stadiile primare, toxina favorizează invazivitatea prin distrugerea celulelor epiteliale şi a celulelor inflamatorii fagocitare.

Toxina difterică este sintetizată numai de bacteriile *lizogenizate* de un virus specific. Toxina este codificată de o genă structurală fagică (*tox*). Gena *tox* poate să se exprime în timpul multiplicării fagului şi chiar când fagul se găseşte în celulă sub forma fagului vegetativ, ca genom liber, nereplicativ şi neintegrat.

Microbiota indigenă din faringe, la om, conţine corinebacterii difteromorfe care nu sintetizează toxina, dar care pot deveni toxice după ce sunt lizogenizate de fag.

Difteria este o maladie care presupune, pe de o parte, interacţiuni complexe între organismul uman şi cel infecţios, iar pe de altă parte, între celula bacteriană şi fagul lizogenizant. Sinteza toxinei nu este relevantă pentru supravieţuirea celulei şi nici pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare virală.

Toxina difterică este sintetizată sub forma unui polipeptid de 62 kDa. Molecula intactă are 2 punţi S-S. Una dintre ele conectează o buclă sensibilă la tripsină. Sub acţiunea tripsinei rezultă *fragmentul A* (24 kDa) şi *fragmentul B* (36 kDa), separabile prin cromatografie.

Mecanismul de acţiune. După ce traversează membrana, toxina acţionează enzimatic asupra EF-2 (factorul 2 de elongaţie a catenei polipeptidice), una dintre enzimele citosolice (solubile) necesare sintezei peptidelor. Celulele procariote nu au această enzimă şi sunt rezistente la acţiunea toxinei.

Toxina posedă o activitate enzimatică unică şi catalizează următoarele reacţii:

$$\text{EF-2} + \text{NAD} \text{ ----- } \underset{\text{EF-2 legat covalent cu adenozin-difosfat-riboza din NAD. EF-2 legat este inactiv.}}{\text{ADPR-EF-2}} + \text{nicotinamida} + H^+$$

Se consideră că stoparea bruscă a sintezei proteinelor determină efectele necrozante şi neurotoxice ale toxinei difterice. O exotoxină cu acelaşi mecanism de acţiune poate fi produsă de *Ps. aeruginosa*.

Difteria la adulţi se poate manifesta sub forme clinice inaparente, asemănătoare cu o faringită virală banală.

Epidemiologie. Difteria este o maladie infecţioasă a zonelor calde şi temperate. În ţările cu climat rece, maladia este rară. Infecţia difterică apare în special la copii, dar are o frecvenţă semnificativă şi la adulţi. Infecţia este specifică pentru colectivităţi şi este condiţionată de nivelul de imunitate şi de circulaţia agentului patogen.

Infecţia difterică nu reprezintă o problemă de sănătate publică, deoarece este controlată prin vaccin: trivaccinul DTP (diftero-tetano-pertusis), până la vârsta de 3 ani; bivaccinul diftero-tetanic, la 6 şi 14 ani; monovaccinul ADPA, pentru populaţia de peste 16 ani.

BUCUREŞTI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După 6–7 ani de la revaccinare, nivelul imunității scade şi apar grupele de risc (populația de 30–40 de ani), deoarece agentul patogen nu circulă. De aceea, au apărut mici focare de difterie în populația adultă. Infecția cu *C. diphteriae* nu se poate eradica, dar procesul patologic se poate elimina.

Diagnosticul necesită următoarele teste:

- testul de toxigenitate, practicat numai în laboratoarele specializate, se bazează pe metoda difuziei anticorpilor specifici dintr-un disc de hârtie de filtru care se depune pe suprafața plăcilor cu mediu agarizat, însămânțat cu tulpinile testate. După 48 de ore de incubare, anticorpii precipită toxina produsă de tulpinile toxigene (fig. 236);

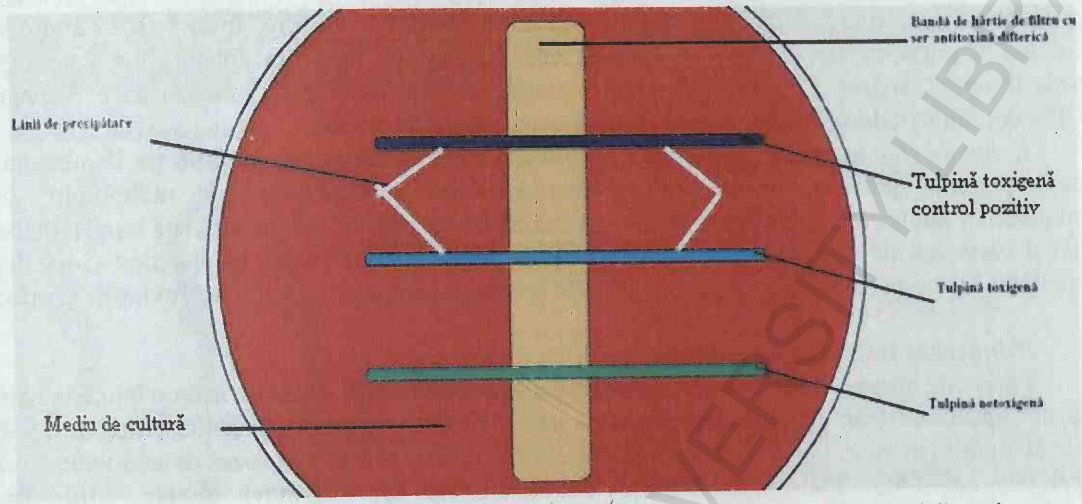


Fig. 236. Reprezentarea schematică a reacției de imuniprecipitare care pune în evidență tulpinile toxigene.

- metoda PCR, pentru detectarea genei tox;
- metoda ELISA, pentru detectarea toxinei difterice produsă de izolatele clinice de *C. diphteriae*.

Pentru controlul infecției se administrează *anatoxina diferică* adsorbită pe sărurile de aluminiu (hidroxid sau fosfat). Vaccinul se administrează sub forma trivaccinului DTP (diftero-tetano-pertusis).

9.2. Genul Listeria

Genul *Listeria,* ce conține şase specii (dintre care *L. monocytogenes* şi *L. ivanovii* sunt implicate în patologia umană şi respectiv animală) este inclus la ora actuală în familia *Listeriaceae,* ord. *Bacillales*, care mai cuprinde şi genul *Brochothrix. L. monocytogenes* este un bacil scurt (asemănător ca morfologie cu *Corynebacterium*), uneori grupat în lanțuri scurte, Gram pozitiv, cu forme cocobacilare (ce pot fi confundate cu streptococii) (Todar, 2008), facultativ anaerob, nesporulat, necapsulat, pozitiv pentru catalază, ce crește uşor pe geloză nutritivă, iar pe agar-sânge produce hemoliză completă de tip β (fig. 237, 238).

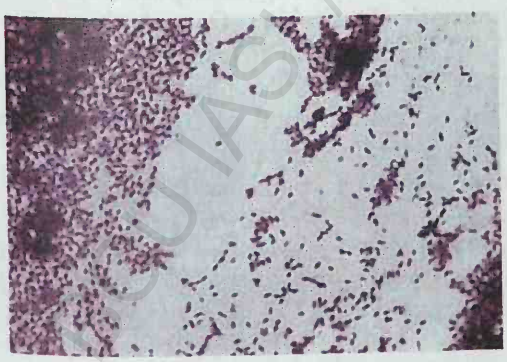


Fig. 237. Morfologia *L. monocytogenes* pe frotiu colorat Gram (Todar, 2008).

Fig. 238. Aspectul culturii de *Listeria* pe geloză sânge (www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/images/kolonier/listba.jpg).

USMF IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Creşte cu o rată optimă la 30–37°C pe mediu Müller-Hinton, este mobilă la temperatura camerei (20–25°C), dar imobilă la 37°C. Creşte la temperaturi de 4–10°C, ceea ce permite îmbogăţirea la rece şi izolarea de alte bacterii contaminante prin incubarea de durată la temperatura de +4°. Creşte bine la pH neutru sau uşor alcalin şi este distrusă la pH mai mic de 5,5. Testul motilităţii rapide şi al hemolizinei diferenţiază *L. monocytogenes* de alte specii de *Listeria*. Fermentează glucidele cu acidifierea mediului, fără gaz.

L. monocytogenes este un agent important al zoonozelor animalelor domestice. Este larg răspândită în natură, fiind prezentă în sol, pe materia vegetală în descompunere şi este de asemenea componentă a microbiotei normale a tubului digestiv al multor mamifere. Între 5–10% dintre adulţii umani pot fi purtători de *Listeria* în intestin, ceea ce explică prezenţa anticorpilor specifici anti-*Listeria* la omul sănătos. *L. monocytogenes* contaminează alimentele: se izolează cu o frecvenţă de 15–70% din alimentele vegetale proaspete, lapte proaspăt, peşte, carne.

L. monocytogenes este un patogen oportunist. Cel mai mare risc de infecţie îl prezintă nou-născuţii, femeile gravide, persoanele imunocompromise şi debilitate (cu malignităţi, supuse chimioterapiei sau terapiei imunosupresoare, cu ciroză sau alcoolism, cu insuficienţă renală, diabet sau lupus) şi vârstnicii de peste 60 de ani, la care poate cauza infecţii severe (septicemie şi meningită). Mortalitatea la aceste grupe de risc este de 30–40%. Adulţii imunocompetenţi supravieţuiesc infecţiei.

Patogeneza infecţiei cu ***Listeria***

Poarta de intrare în infecţia cu *L. monocytogenes* este tractul digestiv, în care bacteria pătrunde odată cu ingestia alimentelor contaminate (derivate din lapte, vegetale). Agentul patogen trebuie să reziste acidităţii gastrice. Ulterior invadează epiteliul intestinal printr-un proces de endocitoză realizat de celulele epiteliale. Traversarea barierei intestinale are loc în câteva minute şi nu necesită multiplicarea. Alteori *L. monocytogenes* pătrunde prin celulele M, care acoperă plăcile Peyer, ce reprezintă situsul preferenţial al multiplicării. *Hemolizina*, ca principal factor de virulenţă, este obligatorie pentru acest proces. După ce ajunge în sânge, diseminarea hematogenă se face în orice ţesut din organism, dar *L. monocytogenes* manifestă un *tropism marcat pentru SNC* şi *placentă*.

Infecţia poate fi limitată la nivelul mucoasei intestinale (enterită), diseminarea bazolaterală a agentului patogen realizându-se direct de la o celulă la alta, printr-un mecanism celular care implică polimerizarea actinei celulare. Perioada de incubaţie pentru infecţia invazivă variază de la 11 la 70 de zile, cu o medie de 31 de zile.

Invazia bacteriană a substratului celular este un proces în mai multe trepte:

- *aderenţa*, care poate fi o interacţie specifică cu molecule receptor sau un proces care anulează forţele de respingere sau efectele hidrofobe ale diferitelor suprafeţe;
- *intrarea* în celula epitelială prin inducerea fagocitozei;
- *multiplicarea* şi *deplasarea* în citoplasma celulei epiteliale;
- *trecerea în celula epitelială adiacentă* pe calea protruziilor digitiforme ale suprafeţei celulei;
- *moartea* celulei gazdă.

Inocularea intravenoasă a evidenţiat că *L. monocytogenes* este rapid eliminată de macrofagele rezidente din splină şi din ficat. Celulele Kupffer ce tapetează sinusoidele iniţiază răspunsul imun anti-*Listeria*, prin stimularea multiplicării limfocitelor T şi secreţia de citokine. O mică proporţie a celulelor bacteriene supravieţuiesc şi cresc numeric în 2–5 zile prin diviziune în hepatocite.

Fagocitele înglobează *L. monocytogenes* prin intermediul receptorilor pentru C3bi şi pentru C1q. Internalizarea este eficientă în absenţa serului, ceea ce indică faptul că interacţiunile non-opsonice receptor-ligand au rol în legarea *L. monocytogenes* la nivelul membranei.

Infecţia sistemică cu *L. monocytogenes* sugerează faptul că celula bacteriană recunoaşte un număr de receptori diferiţi ai celulei eucariote, ce includ *E-caderina* (o glicoproteină transmembranară), *receptorul pentru C1q*, componentele *matricei extracelulare* (heparan-sulfatul (un proteoglican) şi fibronectina). E-caderina este o moleculă de aderenţă intercelulară, dependentă de Ca^{2+}, localizată pe suprafaţa bazolaterală a celulelor epiteliale şi care mediază infecţia celulelor epiteliale polarizate.

Liganzii bacterieni identificaţi sunt proteine de suprafaţă – *internalina Inl A*, *proteina Act A* (inductoare a polimerizării actinei) şi *p60*.

p60 este o *proteină de aderență* a suprafeței bacteriene – o *adezină*, cu rol dublu: leagă celula bacteriană de celula gazdă și declanșează endocitoza. Toate tulpinile invazive secretă *p60* în cantități mari. Proteina se găsește în supernatant, dar probabil o cantitate mică rămâne atașată pe suprafața celulei bacteriene. Probabil, pentru invazie este esențială *p60* legată la suprafața celulei, deși nu poate fi exclus rolul moleculelor libere. *p60* este o proteină bazică și probabil recunoaște un receptor specific acid, sau neutralizează sarcinile negative ale suprafeței celulei gazdă, favorizând un contact mai strâns între cele două celule.

Internalina (*Inl*) *A* este o proteină a suprafeței bacteriene, codificată de gena de virulență (*inl A*), care mediază interacțiunea bacteriei cu receptorii celulei eucariote. Internalina interacționează cu receptorii membranei citoplasmatice (E-cadherina) și induce reorganizarea actinei care determină formarea pseudopodelor și fagocitoza (fig. 239).

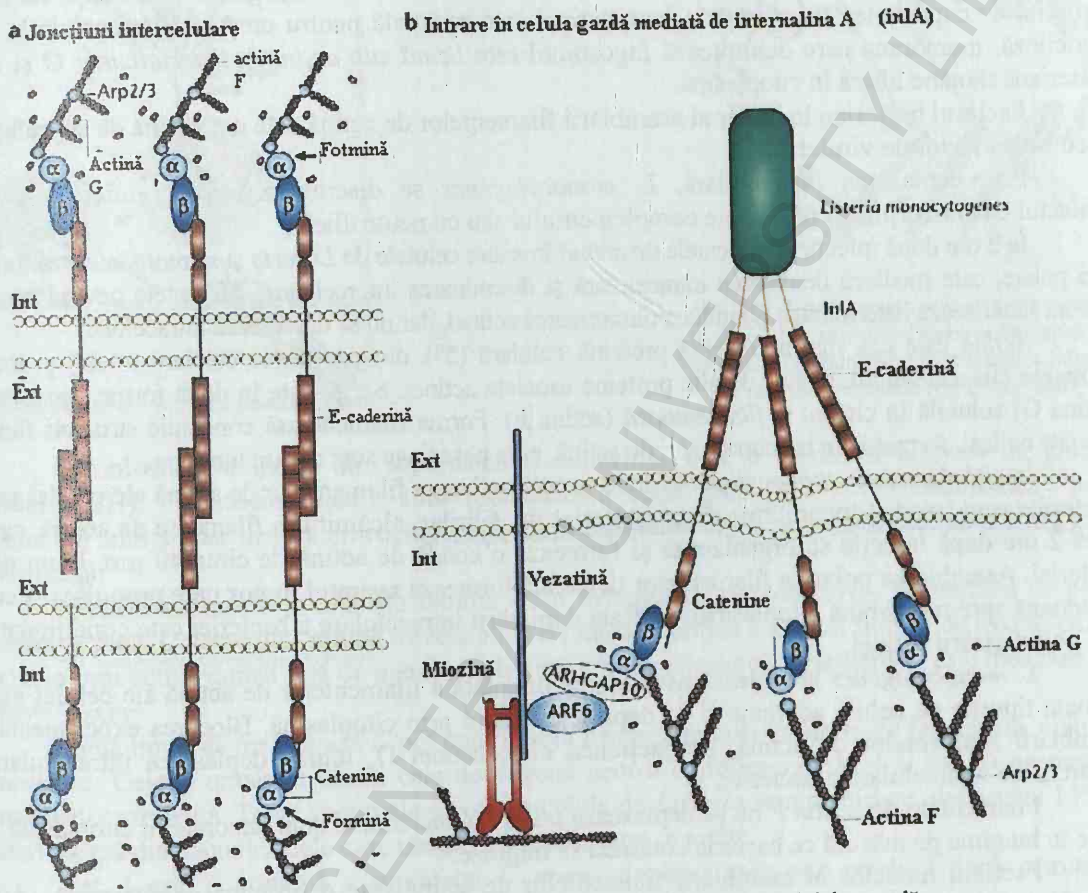


Fig. 239. Reprezentarea schematică a mecanismului invaziei celulelor gazdă de către *Listeria* prin intermediul internalinei A (Hamon și colab., 2006).

Mutațiile în gena *inl A* anulează invazivitatea tulpinii de *L. monocytogenes*. Au fost descrise molecule omologe ale *Inl A* (*Inl B*), care mediază invazia în diferite tipuri tisulare (*Inl B* – pentru hepatocite).

Proprietățile de aderență ale invazinelor sunt diferite de acelea ale adezinelor bacteriilor extracelulare, care de asemenea leagă bacteria de receptorii celulei gazdă, dar nu declanșează endocitoza.

Interacțiunile *L. monocytogenes* – celulă gazdă pot fi mediate de *lectine*.

Multe bacterii patogene invadează țesuturile gazdei prin inducerea funcției endocitare a celulei gazdă. Fenomenul se numește *endocitoză indusă de parazit* și este operativ pentru atașarea și intrarea *L. monocytogenes* în celulele epiteliale ale mucoasei intestinale, dar și *in vitro*, în celulele liniilor maligne. Endocitoza este inhibată de citocalazina D, un agent chimic care inhibă asamblarea microfilamentelor de actină.

Invazia semnifică pătrunderea celulei bacteriene în interiorul celulei gazdă. Fagocitoza se produce printr-un mecanism activ *dependent de actină*, dar independent de clatrină. Celula bacteriană

este endocitată într-o veziculă derivată din membrana citoplasmatică. Invazia substratului celular nu este dependentă de *listeriolizina O*.

Virulența L. monocytogenes este conferită de capacitatea de a crește în celulă, de prezența Fe într-o formă disponibilă, de catalază, de producerea SOD și de o proteină de suprafață cu funcție hemolitică – *listeriolizina O*. SOD oferă protecție față de radicalul superoxid. Tulpinile cu cea mai înaltă activitate catalazică au cea mai înaltă activitate SOD.

Virulența poate fi influențată de temperatura de creștere: la temperatură scăzută (4°C), virulența crește.

In vitro, compușii Fe stimulează creșterea *L. monocytogenes* și sugerează posibila implicare a metabolismului Fe gazdei în procesul infecțios.

L. monocytogenes supraviețuiește și crește în interiorul celulei gazdă. Virulența bacteriană conferită de capacitatea de secreție a hemolizinei este esențială pentru creșterea intracelulară. După fagocitoză, membrana care delimitează fagosomul este *lizată sub acțiunea listeriolizinei O* și celula bacteriană rămâne liberă în citoplasmă.

Factorul bacterian inductor al asamblării filamentelor de actină este o proteină de suprafață *Act A*, cu rol de factor de virulență.

Prin deplasarea intercelulară, *L. monocytogenes* se disemineză foarte eficient, evitând contactul cu anticorpii, cu proteinele complementului sau cu neutrofilele.

În 2 ore după infecție, filamentele de *actină* învelesc celulele de *Listeria* și se reorganizează formând cozi polare, care mediază deplasarea intracelulară și diseminarea intercelulară. Mutantele nevirulente (cele care nu sintetizează listeriolizina O) induc polimerizarea actinei, dar nu se deplasează intracelular.

Actina este cea mai abundentă proteină celulară (5% din proteinele celulare totale) și intră în alcătuirea citoscheletului, alături de alte proteine asociate actinei. Se găsește în două forme: *monomerică* (actina G) solubilă în citosol și *filamentoasă* (actina F). Forma filamentoasă constituie structuri flexibile aranjate helical, formate din homopolimeri de actină, care pot atinge sute de μm lungime.

În citoplasmă, *L. monocytogenes* induce polimerizarea filamentelor de actină ale celulei gazdă. Bacteriile sunt imediat înconjurate de un material fin, fibrilar, alcătuit din filamente de actină, care la circa 2 ore după infecție se organizează și formează o coadă de actină de circa 40 μm, la un pol al bacteriei. Asamblarea polară a filamentelor de actină formează aparatul motor care propulsează celula bacteriană spre membrana citoplasmatică. Rata deplasării intracelulare a bacteriei este condiționată de rata polimerizării actinei.

L. monocytogenes stimulează asamblarea orientată a filamentelor de actină ale celulei gazdă, în toate tipurile de celule aderente și se deplasează rapid prin citoplasmă. Blocarea experimentală a asamblării filamentelor de actină, sub acțiunea citocalazinei D, inhibă deplasarea intracelulară și diseminarea intercelulară a bacteriei.

Filamentele de actină *F* nu se deplasează odată cu bacteria, ci sunt ancorate în citoplasmă. Ele cresc în lungime pe măsură ce bacteria continuă să migreze.

Factorul inductor al asamblării filamentelor de actină este o proteină de suprafață -*Act A*, sintetizată de celula bacteriană. Tulpinile de *L. monocytogenes* mutante pentru gena *act A* nu asamblează actina, nu se deplasează în celulă și nu se disemineză în monostratul celular.

Unele celule de *L. monocytogenes* ajung la periferia celulei, vin în contact cu membrana, unde determină formarea unor prelungiri digitiforme (filopodii, protruzii), la a căror extremitate se găsește câte o celulă bacteriană. Protruziile pot fi ingerate de celulele adiacente (macrofage, enterocite, hepatocite) printr-un proces de endocitoză (fig. 240).

Factorii de virulență

Listeriolizina O este un factor major al virulenței și secreția sa este esențială pentru creșterea intracelulară a bacteriei. Este o hemolizină (Hly) care lizează vezicula membranară de endocitoză și permite trecerea bacteriei în citoplasmă, unde crește, se multiplică și se disemineză intercelular (fig. 241).

Tulpinile Hly^- invadează substratul celular ca și tulpinile Hly^+, dar capacitatea de supraviețuire ulterioară în celulă este diminuată semnificativ.

Tulpinile Hly^- induc polimerizarea actinei, dar nu se deplasează în citoplasmă. Învelișul de actină nu se reorganizează și celulele bacteriene nu se disemineză în celulele învecinate.

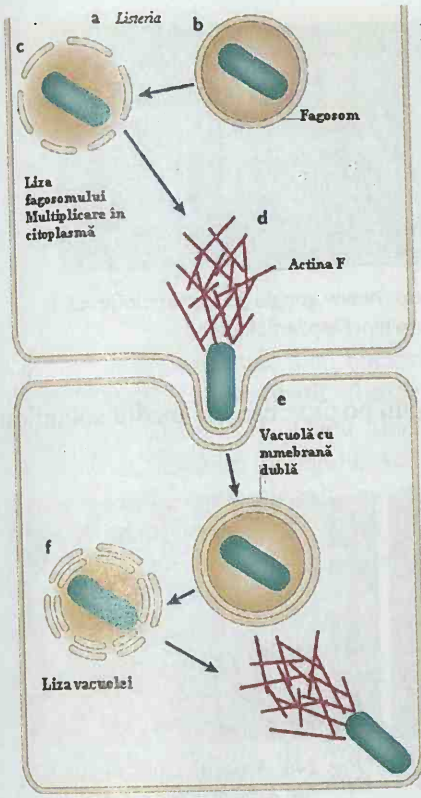


Fig. 240. Reprezentarea schematică a ciclului intracelular în infecția cu *Listeria* (Hamon și colab., 2006).

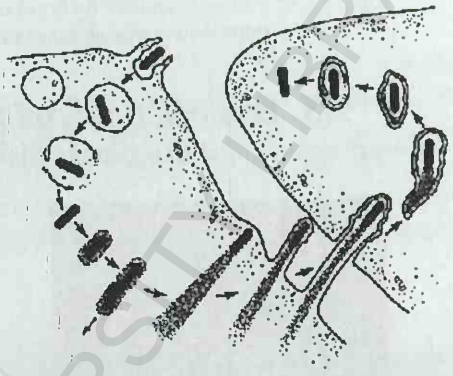


Fig. 241. Reprezentarea schematică a modului în care LLO permite eliberarea bacteriei din vacuolele de endocitoză și propagarea infecției la celulele învecinate (Goldberg, 2001).

Hemolizina s-a izolat din supernatantul culturii și este o citolizină activată de gruparea sulfhidril (SH). Este asemănătoare altor proteine din acest grup (SLO). Nu este toxică pentru organismul animal, dar lizează eritrocitele, eliberând cantitatea de Fe necesar bacteriei, mărind gradul de virulență.

Hemolizina este o toxină din familia celor *dependente de colesterol*, formatoare de pori în membrana țintă. Colesterolul inhibă ireversibil activitatea citolitică a acestei familii de toxine-enzime. Toxinele sunt active numai față de membranele care conțin colesterol. Colesterolul este molecula țintă a acestei toxine.

Două tipuri de *fosfolipază C* pot contribui la liza membranei vacuolei de fagocitoză, alături de *hemolizină*. Deleția oricăreia dintre cele două gene pentru fosfolipaze (*plc A* și *plc B*) nu modifică semnificativ virulența. Toate vacuolele ce conțin celule de *Listeria* sunt acidifiate, dar numai 14% din bacterii scapă din vacuole. Cele care rămân în vacuole sunt omorâte.

Act A este o proteină a suprafeței *L. monocytogenes* care este produsă după pătrunderea bacteriei în celula gazdă și este ancorată în membrana celulei bacteriene printr-o secvență de 26 aminoacizi de la capătul COOH, în timp ce prin capătul NH_2 interacționează cu monomerii de actină, prin intermediul proteinelor VASP- (*vasodilator-simulated phosphoprotein*), care leagă actina G și F (fig. 242).

Infecția clinică. Infecția intrauterină produce granulomatoza infantiseptică, o formă cu leziuni granulomatoase diseminate în ale cărei celule se găsește *L. monocytogenes*. La adulții imunosupresați poate apărea o meningoencefalită bacteriană, cu manifestări clinice variate, de la forma insidioasă la cea fulminantă.

Animalele domestice și sălbatice se infectează odată cu ingestia masei vegetale contaminate. La rumegătoare poate să producă meningoencefalită, cu sau fără bacteriemie.

Diagnosticul infecției cu *L. monocytogenes* presupune izolarea agentului infecțios din sânge sau din lichidul cefalorahidian.

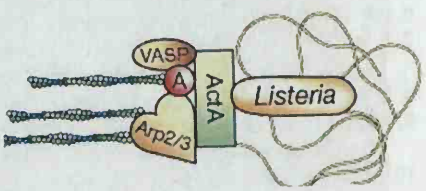


Fig. 242. Reprezentarea modului în care ActA interacționează cu VASP (*vasodilator-simulated phosphoprotein*), a cărei structură o mimează, și cu monomerii de actină Arp 2/3 (Gruenheid și Finlay, 2003).

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

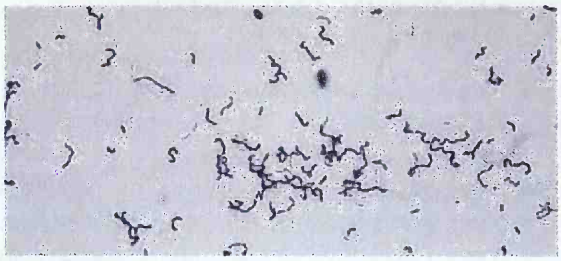


Fig. 243. Morfologia celulelor de *Erysipelothrix* pe frotiu colorat Gram (http://www.google.ro/iErysipelothrix&), (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=62).

9.3. *Erysipelothrix rusiopathiae* este un bacil Gram pozitiv, care pe mediu solidificat formează colonii mici transparente, strălucitoare (fig. 244).

Fig. 244. Aspectul culturii de *Erysipelothrix* pe geloză sânge (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=62).

Fig. 245. Aspectul clinic al erisipelului la porc.

Fig. 246. Aspectul clinic al infectiei cu *Erysipelothrix* la om.

Se decolorează uşor şi uneori apare ca fiind Gram negativ. Pe mediul TSI produce H_2S, caracter prin care se deosebeşte de *L. monocytogenes*. Testele catalazei, oxidazei şi al producerii indolului sunt negative. Este β-hemolitic. Infectează porcul (la care produce erizipelul) oaia, curca, rața (fig. 245). Omul se contaminează cu *E. rusiopathiae* prin contact direct cu animalele sau cu produsele acestora, iar infecția produce leziuni de culoare violacee la degete, caracterizate prin edem şi durere (fig. 246). Lipseşte puroiul, ceea ce o deosebeşte de infecția tegumentară cu *Staphylococcus sp.* Infecția cu *E. rusiopathiae* se vindecă în 3–4 săptămâni cu penicilina G.

Bibliografie selectivă

1. Gruenheid S., Finlay B. B. 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. Nature 422: 775–781
2. Hamon M., Bierne H., Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nature Reviews Microbiology 4:423–434
3. http://mcb.berkeley.edu/labs/portnoy/Listeria
4. http://www.google.ro/iErysipelothrix
5. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=62
6. http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/tracto-respiratorio-superior2.shtml
7. http://www.sciencephotolibrary.com/images/showFullWatermarked.html/B220081-LM_of_Corynebacterium_diphtheria_bacteria-SPL.jpg
8. http://www.thefullwiki.org/Corynebacterium_diphtheriae
9. Marcia B. Goldberg – Actin Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens – Micr. and Mol. Biol. Rev, 2001, vol. 65, no.4, pp. 595–626.
10. Murray, et al.: Medical Microbiology, 3rd ed., 2010, Ghaffar A. Chapter 17. Zoonoses. Listeria, Francisella, Brucella, Bacillus and Yersinia.
11. Todar K. 2008. Todar's Online Textbook of Bacteriology. www.textbookofbacteriology.net
12. www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/images/kolonier/listba.jpg

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10. ACTINOBACTERII

Actinomicetele sunt bacterii filamentoase Gram pozitive, înrudite cu corinebacteriile şi includ reprezentanţi cu implicaţii clinice majore (*Mycobacterium* sp.), precum şi organisme saprobionte (genul *Streptomyces*). După diviziune, bacilii rămân asociaţi şi formează lanţuri lungi, uneori ramificate. Speciile patogene se diferenţiază pe baza comportamentului faţă de coloraţia Ziehl-Neelsen: cele acido-alcoolo-rezistente aparţin genului *Mycobacterium*; cele care dau o reacţie uşor pozitivă sunt incluse în genul *Nocardia*, iar cele negative pentru acido-alcoolo-rezistenţă aparţin genului *Streptomyces* şi *Actinomadura*.

10.1. *Nocardia asteroides*

este un complex de specii patogene şi nepatogene, care se găsesc în sol şi în apă, diferenţiate pe baza sensibilităţii la antibiotice. Speciile de *Nocardia* sunt aerobe, Gram pozitive, pozitive pentru testul catalazei şi acidorezistente, produc urează şi hidrolizează parafina. În substrat, filamentele se ramifică, iar cele aeriene se fragmentează şi formează cocobacili. În peretele celular se găsesc acizi micolici cu catenă mai scurtă decât la *Mycobacterium*. Sunt considerate ca acidorezistente, dar se decolorează cu acid sulfuric 1–4%.

Fig. 247. Nocardia – frotiu din produsul patologic colorat Gram (http://www.med.cmu.ac.th/dept/pediatrics/06-interest-cases/ic-8-nocardia/case3.htm).

Nocardia este un agent patogen oportunist pentru indivizii cu disfuncţii ale imunităţii mediate celular, pentru imunosupresaţi, pentru pacienţii SIDA, alcoolici sau pentru cei trataţi cu corticosteroizi. *N. asteroides* produce o infecţie pulmonară cronică, cu posibilă diseminare la creier şi tegument. Infecţia cu *Nocardia* începe ca o pneumonie lobară cronică, manifestările fiind aceleaşi ca şi în cazul tuberculozei. Formarea granulomului şi cazeificarea sunt evenimente rare, aspectul patologic comun fiind formarea abcesului.

Pentru diagnostic se fac frotiuri din spută, puroi, LCR sau chiar din materialul biopsiei. Pe frotiul colorat Gram se observă cocobacili, bacili şi filamente lungi, uneori ramificate (fig. 247, 248).

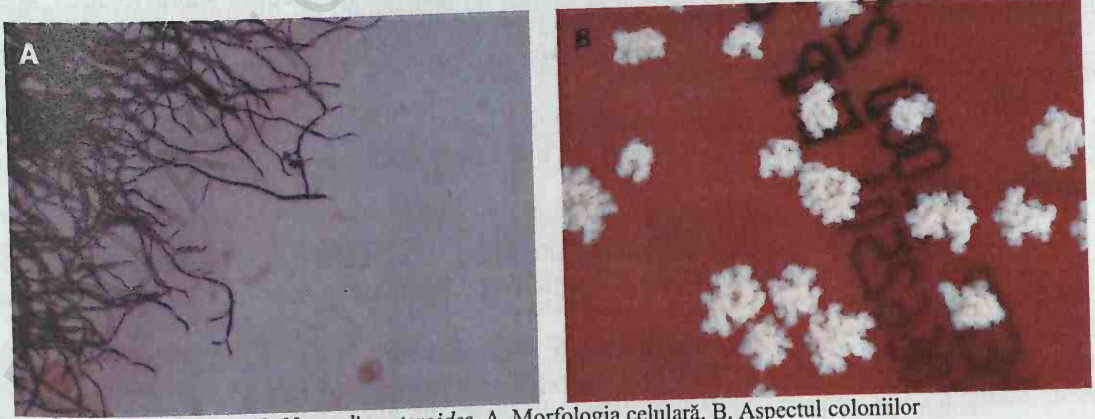


Fig. 248. Nocardia asteroides. A. Morfologia.celulară. B. Aspectul coloniilor pe geloză sânge (World J Gastroenterol. 2008 August 28; 14(32): 4977-4983).

Micetomul este o infecție cu progresie lentă, distructivă, nedureroasă, care se inițiază în țesutul conjunctiv al dermului și se disemnează prin continuitate în țesuturile adiacente (fig. 249, 250).

Fig. 249. Infecție cutanată cu *Nocardia* (http://www.asm.org/division/c/photo/nocard1.JPG).

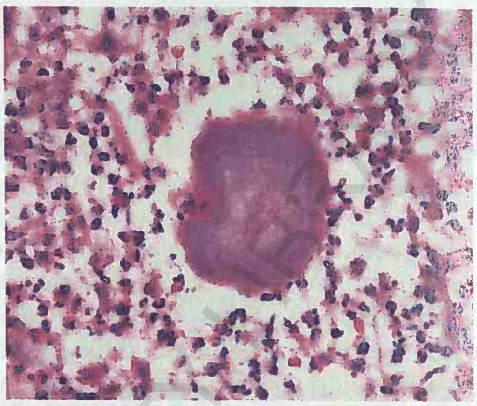


Fig. 250. Secțiune printr-un actinomicetom. Preparat histopatologic (http://www.flickr.com/photos/euthman/2111203428/).

Adeseori, leziunea este datorată contaminării cu fungi din sol, care colonizează țesutul subepitelial prin traumatisme minore. *Actinomicetomul* este un micetom produs de bacterii filamentoase ramificate: *Nocardia asteroides, N. brasiliensis, Actinomadura*. Leziunea este granulomatoasă, alcătuită din componente tisulare, bacili și filamente ramificate.

Agentul infecțios este sensibil la streptomicină, trimetoprim, sulfametoxazol, dapsone, dacă terapia începe timpuriu.

10.2. Genul Mycobacterium

Genul *Mycobacterium* a fost descris în 1881 de către R. Koch. Celulele sunt bacili nesporulați, imobili. Pe medii artificiale apar forme cocoide sau filamentoase. Nu sunt clasificate Gram pozitive sau Gram negative, pentru că se colorează greu datorită caracterului hidrofob al suprafeței, dar după colorare în condiții energice cu fuxină concentrată la cald, rezistă acțiunii decolorante cu acid și alcool, proprietate denumită *acido-alcoolo-rezistență*. Acido-alcoolo-rezistența se datorează compoziției chimice particulare a peretelui celular: acizi micolici cu catenă lungă de 78–90 atomi de C legați covalent de arabinoza și galactoza care formează polizaharidul parietal.

Reprezentanții genului *Mycobacterium* sunt obligat aerobi și *in vitro* se dezvoltă numai în condiții de aerare, iar *in vivo* infectează țesuturile cu o presiune parțială crescută a O_2. Micobacteriile au o compoziție chimică distinctă de a celorlalte bacterii: conțin o cantitate mare de lipide, glicolipide și ceruri, care le conferă caracterul hidrofob al suprafeței celulare, precum și acidorezistență sau rezistență la dezinfectanții simpli. Glicolipidele sunt importante pentru supraviețuirea speciilor parazite în monocit. Timpul de generație este mai mare de 20 de ore.

Speciile de interes clinic: *M. tuberculosis, M. leprae* și *M. avium intracellulare* (*M. avium* complex = MAC).

M. tuberculosis (bacili subțiri, drepți, de 0,4/3 μm) și într-o măsură mai mică *M. bovis*, sunt agenții tuberculozei, un proces patologic de mare importanță medicală. Infecția are un timp îndelungat de incubație, este latentă și are o evoluție lentă.

M. tuberculosis crește pe următoarele categorii de medii:

- *medii de* izolare: pot fi neselective sau selective prin adăugarea de antibiotice inhibitorii pentru microorganismele contaminante (cele mai folosite sunt mediile cu ou, Lowenstein și Jensen);
- *medii de întreținere,* cu glicerină: bulionul glicerinat, cartoful glicerinat, geloza glicerinată. Tulpinile izolate de la om cresc foarte bine în prezența glicerinei, iar cele izolate de la bovine (*M. tuberculosis bovis*) sunt inițial inhibate și cresc numai după o perioadă de adaptare;

– *mediile sintetice* (conţin săruri, vitamine, cofactori, acid oleic, glicerol) creează condiţii particulare de creştere, ceea ce duce la apariţia modificărilor morfologice, antigenice şi de virulenţă. Nu au niciun factor de creştere: Sauton, Dubos, Long. Dubos a adăugat la mediul sintetic, substanţe care accelerează creşterea *M. tuberculosis*, favorizând creşterea dispersată şi omogenă. O astfel de substanţă este Tween 80 (un ester al acidului oleic), un detergent solubil în apă, care hidratează suprafaţa celulei bacteriene. Pe mediu sintetic cu bilă de bou, s-a obţinut mutanta nevirulentă BCG (bacilul Calmette-Guerin), care îşi păstrează avirulenţa din 1923.

Pe mediile solide, coloniile de *M. tuberculosis* apar după 10—14 zile de incubare, iar ale variantei bovine, după 30–70 de zile. Coloniile sunt aderente la mediu şi emulsionează greu. Pe mediile lichide, cultura formează o membrană care se încreţeşte şi se brunifică. La început mediul se alcalinizează, apoi se acidifică şi rămâne limpede. Datorită conţinutului ridicat de lipide ale peretelui, celulele sunt hidrofobe şi au tendinţa de a adera în timpul creşterii pe medii apoase. Tulpinile virulente cresc în structuri serpentiforme, în care bacilii acido-alcoolo-rezistenţi sunt aşezaţi în cordoane lungi, paralele. Formarea cordoanelor celulare reflectă virulenţa şi se datorează unui compus – trehaloza-6,6'-dimicolat (*cord factor*). Factorul "cord" a fost extras din tulpinile virulente, cu eter de petrol, este chimiotactic negativ pentru fagocite şi stimulează formarea *granuloamelor cronice*.

Micobacteriile sunt organisme strict aerobe. Creşterea presiunii parţiale a O_2 favorizează creşterea culturii. Timpul de generaţie este de circa 18 ore. Speciile saprobionte cresc mai repede şi sunt numai acido-rezistente. Metabolizează o largă varietate de compuşi simpli.

Deşi sunt nesporulate, datorită compoziţiei chimice speciale a peretelui celular, celulele de *M. tuberculosis* sunt rezistente la acţiunea factorilor fizici şi chimici. La 70°C îşi pierde viabilitatea în 10 min. În produsele patologice (sputa), rezistă 5 minute la 100°C. În lapte, bacilul tuberculos moare după 10 minute la 70°C. Lumina solară şi uscăciunea distrug rapid celulele de *M. tuberculosis*. Bacilii din spută îşi pierd viabilitatea în 14 zile, în încăperile contaminate şi expuse luminii solare, dar în încăperile întunecoase rămân infecţioşi luni şi chiar ani de zile. În praf, *M. tuberculosis* rezistă circa 10 zile, pe haine şi pe filele cărţilor – 3 luni, în noroi – 4–8 luni. În produsele patologice, agentul patogen este mult mai rezistent: cadavrele infectate şi îngropate păstrează viabilitatea *M. tuberculosis* un interval de ordinul anilor. Acidul fenic 5% distruge *M. tuberculosis* în 5 minute, iar $HgCl_2$, într-o oră.

M. tuberculosis este sensibil la acţiunea unor antibiotice şi a unor agenţi antimicrobieni de sinteză, care îi modifică metabolismul şi blochează multiplicarea, putând fi astfel mai uşor fagocitat: streptomicina, acidul paraaminosalicilic (PAS), tiosemicarbazona, hidrazida acidului izonicotinic. Toate aceste medicamente au efect bacteriostatic (blochează multiplicarea). Rezistenţa *M. tuberculosis* se poate instala repede, în funcţie de doza administrată, ceea ce face ca preparatele să devină inutilizabile.

Variabilitatea se manifestă în aspectul coloniilor, pigmentaţie, virulenţă, temperatura optimă de creştere.

Epidemiologie. M. tuberculosis şi *M. bovis* sunt la fel de virulente pentru om. Infecţia primară se face prin *aerosolii* eliminaţi de persoanele cu proces patologic evolutiv, sau pe cale digestivă, după consumul alimentelor contaminate (carne, lapte), insuficient tratate termic. Aerosolii de 1–5 μm ajung în alveole. Contactul familial şi expunerea amplă, în special a personalului medical, uşurează transmiterea bacilului tuberculos prin aerosoli.

La adult, tuberculoza evoluează de obicei prin reactivarea focarelor latente şi doar rareori, prin reinfecţie. Tuberculoza de reactivare începe în zonele cele mai aerisite ale plămânului (apexul pulmonar) şi se caracterizează prin leziuni tisulare cronice: formarea granuloamelor, cazeificarea şi fibroza. Ganglionii regionali nu se cazeifică, fiind puţin implicaţi.

Patologie. Diferitele specii de organisme au grade foarte diferite de sensibilitate la infecţia cu *M. tuberculosis*: omul şi cobaiul sunt foarte sensibile, iar păsările şi cornutele sunt rezistente. Se estimează că anual apar circa 8 milioane de cazuri noi de tuberculoză. Circa 1/3 din populaţia globului (2 miliarde) este infectată cu *M. tuberculosis*, bacilii fiind sechestraţi în granuloame mici. Majoritatea (mai mult de 90%) nu dezvoltă boala, iar restul, în condiţiile scăderii reactivităţii imunitare, dezvoltă un proces patologic tuberculos (fig. 251).

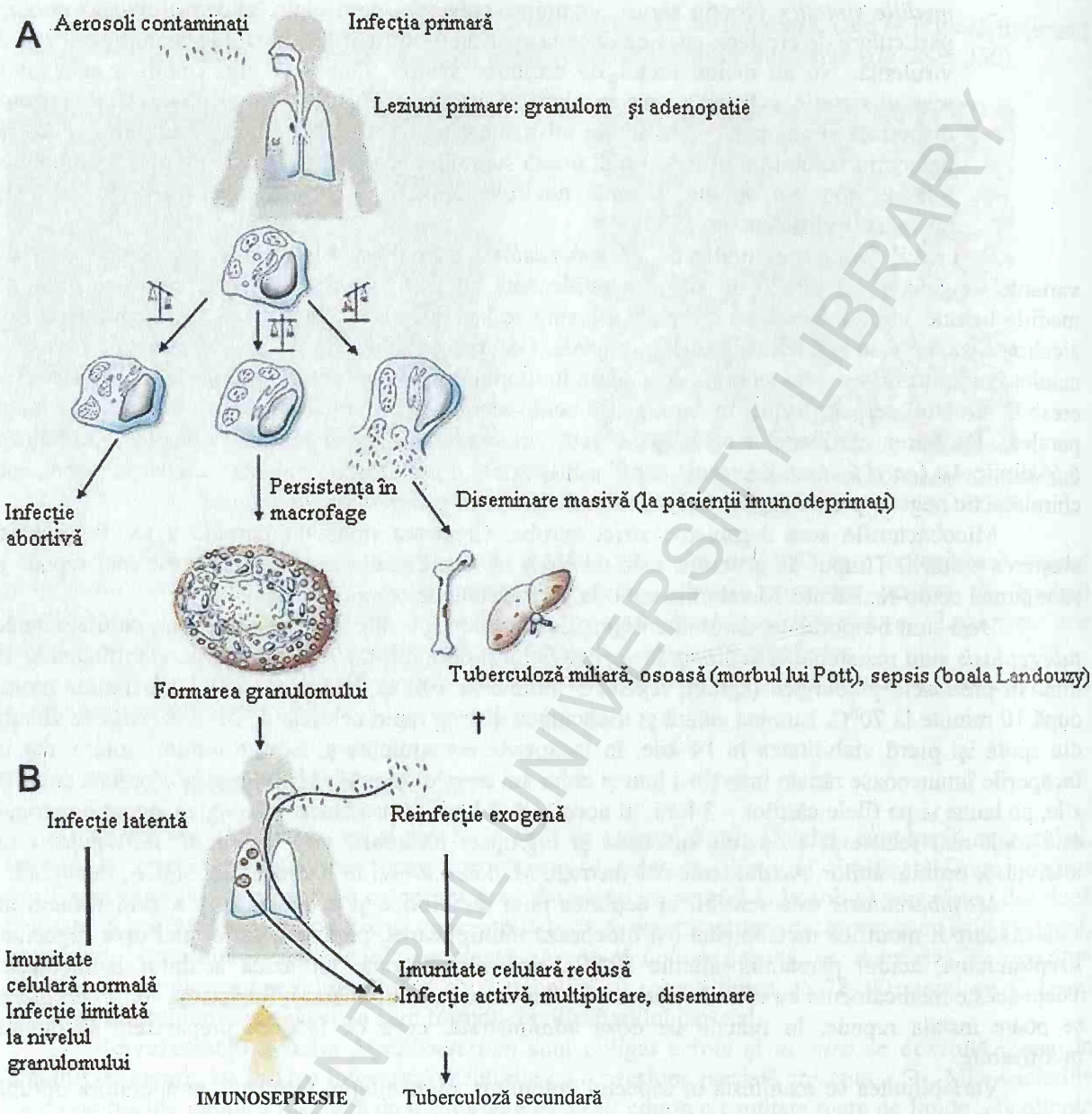


Fig. 251. Evoluția infecției tuberculoase. A). *M. tuberculosis* este inhalat odată cu aerosolii, iar după o perioadă de incubație de 4–12 săptămâni, macrofagele alveolare distrug majoritatea bacililor infectanți, însă o mică parte pot persista în macrofage. Dacă sistemul imunitar și virulența agentului infecțios sunt în echilibru, macrofagele infectate vor fi izolate prin formarea granulomului (leziunea primară). B). *M. tuberculosis* poate astfel persista în stare latentă pentru perioade lungi de timp, însă la apariția unui dezechlibru între parazit și gazdă sau prin contaminare exogenă, infecția se poate reacutiza (Ulrichs și Kaufmann, 2002).

Plămânul este sediul principal al infecției și al procesului patologic, dar bacilul se poate disemina pe cale sanguină sau limfatică, în oricare țesut. Amploarea procesului patologic este influențată de numărul bacililor din inocul, de gradul multiplicării agentului patogen și de reactivitatea imunitară a gazdei. Bacilii nevirulenți (din vaccinul BCG) supraviețuiesc în gazda imunoreactivă, un interval de luni sau câțiva ani.

După ce *M. tuberculosis* se stabilește în țesuturi, rezidă în monocite, în celulele *reticuloendoteliale** și în celulele gigante. Localizarea intracelulară favorizează persistența infecției.

* Sistemul reticuloendotelial cuprinde *fagocitele* propriu-zise, *celulele reticulare ale sinusurilor* venoase din splină și ganglioni și *celulele endoteliale* ale vaselor sanguine și limfatice.

BCU MEDICINA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Leziunile infecției cu *M. tuberculosis* sunt de două tipuri:

- tipul *exsudativ*, datorat unei reacții inflamatorii acute, cu edem, PMN, monocite, în jurul bacililor tuberculoşi pulmonari. Leziunea se poate vindeca prin absorbția edemului, sau fagocitele activate din focar îşi varsă conținutul enzimatic şi țesutul se necrozează;
- tipul *productiv*, caracterizat prin formarea *granulomului cronic*. Structural, granulomul este format din 3 zone: *centrală*, cu celule mari, multinucleate, de origine monocitară, cu bacili tuberculoşi; *intermediară*, cu celule epitelioide, adeseori orientate radiar; *periferică*, cu limfocite, monocite, fibroblaste şi fibre de colagen.

Granulomul este un țesut de răspuns la un material exogen *particulat*, dar nu este totdeauna datorat unui proces infecțios. Formarea granulomului este indusă de persistența celulelor infecțioase şi de încărcarea macrofagelor cu pulberi nedegradabile (talc, siliciu, azbest, cărbune). *Granulomul pulmonar tuberculos** este consecința persistenței celulelor de *M. tuberculosis,* atribuită unor factori care împiedică fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoză. Este o structură care izolează celulele infectate cu *M. tuberculosis* şi previne diseminarea lor.

* Plămânul este implicat în 85% dintre cazurile de tuberculoză. La persoanele imunocompetente maladia este limitată la țesutul pulmonar, deoarece, în celelalte țesuturi, diseminarea infecției este controlată de SI. La persoanele cu SIDA, tuberculoza este o maladie sistemică şi implică organe multiple.

Persistența *M. tuberculosis* se datorează incapacității macrofagelor de a deveni micobactericide.

Fagocitele activate de materialul particulat endocitat, eliberează enzime proteolitice, care produc leziuni tisulare. Primele leziuni sunt de tip *exsudativ*. Treptat, celulele infiltrate sub acțiunea factorilor din exsudat se organizează şi formează un *granulom* alcătuit din macrofage.

Reacția granulomatoasă este cea care determină efectele patologice ale infecției cu *M. tuberculosis* sau cu *M. leprae*. În funcție de structura histologică, granuloamele pot fi *imune* sau *neimune*.

Granulomul tuberculos este de natură imună, în a cărui structură, celulele SFM se diferențiază, dobândesc morfologia celor epiteliale şi se numesc *celule epitelioide* sau fuzionează şi rezultă *celule gigante*. Ele sunt celule fagocitare mononucleare şi constituie cea mai importantă caracteristică structurală a granuloamelor. Se crede că celulele epitelioide au funcție secretorie.

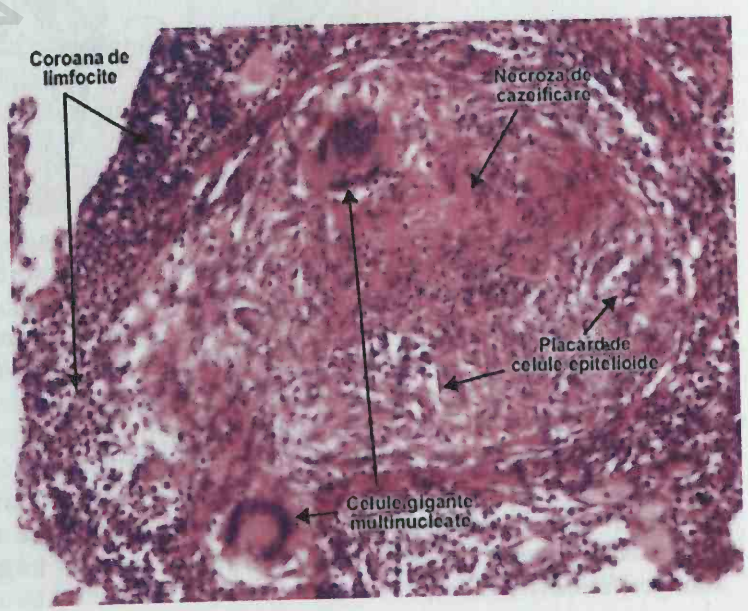


Fig. 252. Granulom giganto-epitelioid tuberculos în interstițiu. Preparat histopatologic, colorație cu hematoxilină-eozină, ob. x 4 (http://www.pathologyatlas.ro/tuberculoza-pulmonara-morfopatologie-aparat-respirator.php).

USMF IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Celulele *gigante* din granuloamele imune sunt de tip Langhans, cu nuclei periferici, fără reticul granular.

Alte celule din structura granulomului sunt *limfocitele* şi *fibroblastele*. Sinteza *colagenului*, care duce la fibroză, este o trăsătură particulară a granulomului de hipersensibilitate. Se sintetizează prostaglandine (PG) şi citokine. Pacienţii cu granuloame imunitare şi cu silicoză au o fibroză accentuată în aria granulomului.

Răspunsul imun anti-tuberculos este indus şi generat în ţesuturile limfoide secundare care drenează situsul infecţios. Antigenele de *M. tuberculosis* sau celulele întregi trebuie să ajungă în ganglionii regionali prin limfa aferentă. Celulele dendritice (CD) trec din sânge în situsurile infecţioase, preiau antigenele de *M. tuberculosis* şi prin limfa aferentă ajung în regiunea paracorticală, unde prezintă aceste antigene limfocitelor T neinformate. Acestea migrează în focarul infecţios şi devin componente ale granulomului (fig. 253).

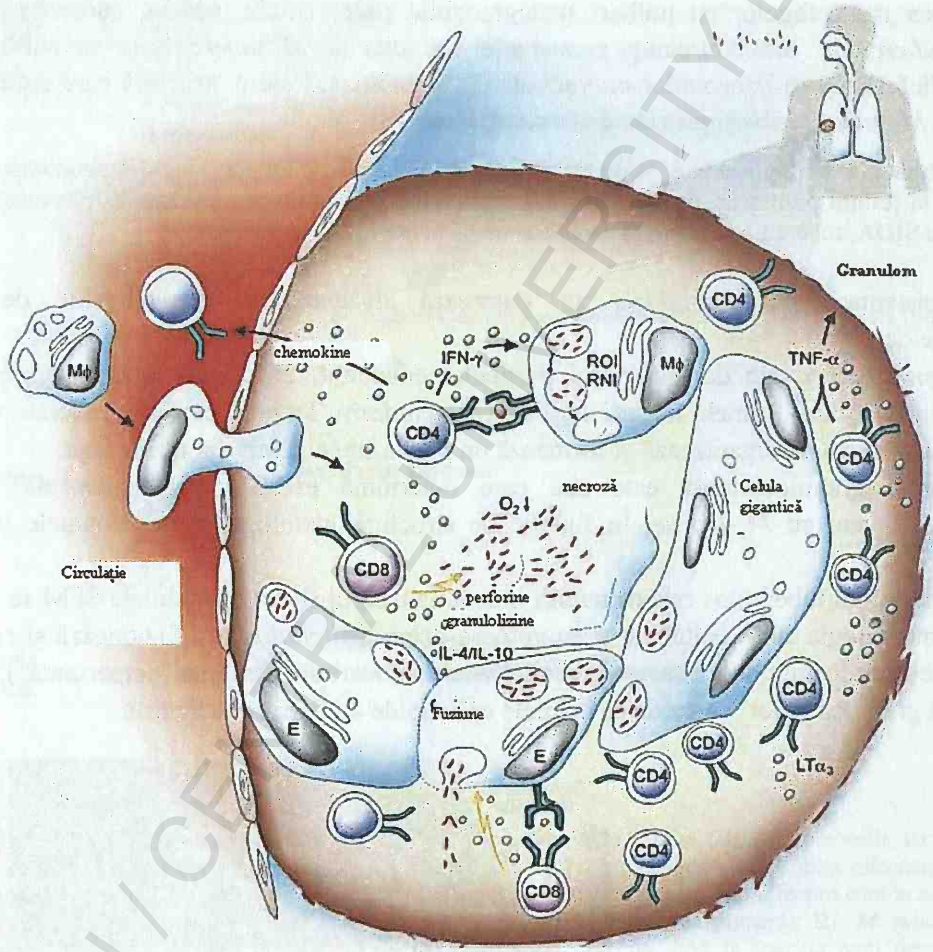


Fig. 253. Răspunsul imun al gazdei la infecţia cu *Mycobacterium tuberculosis* şi formarea granulomului (Ulrichs şi Kaufmann, 2002).

Macrofagul este o celulă esenţială a granulomului, pentru că *M. tuberculosis* rezidă exclusiv în macrofage la situsul infecţios pulmonar. Originea lor este incertă: pot să derive din macrofagele alveolare prin diviziune, dar mai probabil din monocitele sanguine. Funcţia anti-*M. tuberculosis* a macrofagelor pulmonare se exprimă numai după ce limfocitele TCD_4 şi CD_8 extravazează din sânge în alveole, la situsul infecţios. Macrofagele alveolare infectate cu *M. tuberculosis* se activează, secretă citokine proinflamatorii şi chemokine, generează NO şi O_2^- cu efect anti-bacterian, se hipertrofiază şi dobândesc caractere morfologice *epitelioide* sau *fuzionează* şi formează *celule gigante*. Ele ocupă o poziţie centrală în granulom, iar limfocitele TCD_4 şi CD_8 sunt periferice (fig. 254).

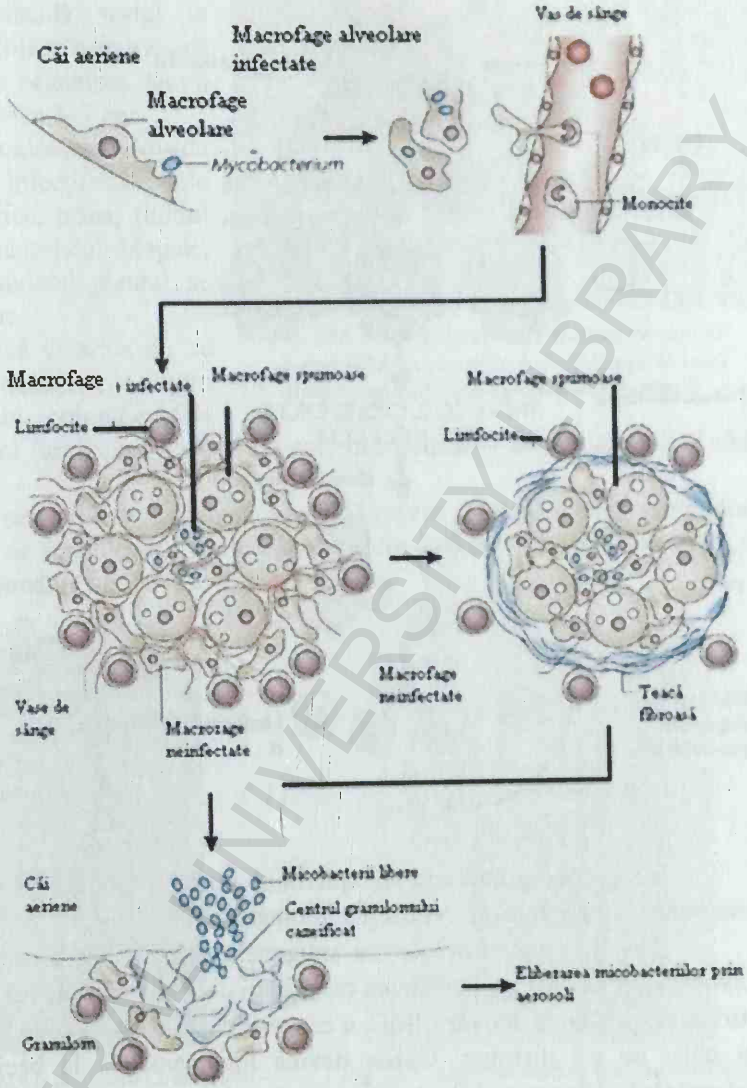


Fig. 254. Evoluția granulomului tuberculos (Russel, 2007).

Celulele T CD_8 și CD_4 stimulează imunitatea anti-*M. tuberculosis* pe mai multe căi ipotetice (fig. 255):

- secretă IFN γ, care activează macrofagul la o stare microbiostatică;
- secretă substanțe cu efect litic față de *M. tuberculosis;*
- CD_8 lizează macrofagele infectate cu *M. tuberculosis*.

În jurul celulelor din focar, *fibroblastele* proliferează și sintetizează colagen, formând un *țesut fibros* de acoperire.

Evoluția granulomului tuberculos. Granuloamele care conțin bacili de *M. tuberculosis* rămân latente pentru zeci de ani, la circa 90% dintre cei aproximativ 2 miliarde de indivizi cu infecție latentă, dar fără manifestări clinice. La restul de 10%, celulele centrale ale granulomului se lizează din mai multe cauze: lipsa O_2, proliferarea bacililor tuberculoși, acțiunea TNF și a limfocitelor Tc. După liza celulelor centrale ale granulomului, se formează *granuloame cazeoase* (de consistența cheagului de cazeină), favorabile dezvoltării celulelor de *M. tuberculosis*. După ruperea peretelui fibros, bacilii se disemineză prin contiguitate în țesutul adiacent, pe cale sanguină în alte organe, sau pe cale aeriană, la alți indivizi. Distrugerea țesutului granulomatos, ce duce la *cazeificare* și *cavitație*, este o particularitate a tuberculozei, fiind rară sau chiar absentă în celelalte granuloame, imune sau neimune.

Unul dintre factorii cazeificării este TNFα. La pacienții tuberculoși, fagocitele mononucleare eliberează cantități mai mari de TNFα, în prezența unor componente ale celulelor de *M. tuberculosis*.

Cazeificarea poate fi o trăsătură a granuloamelor cu celule epitelioide sau a gomelor sifilisului terțiar. Granuloamele de sarcoidoză nu se cazeifică.

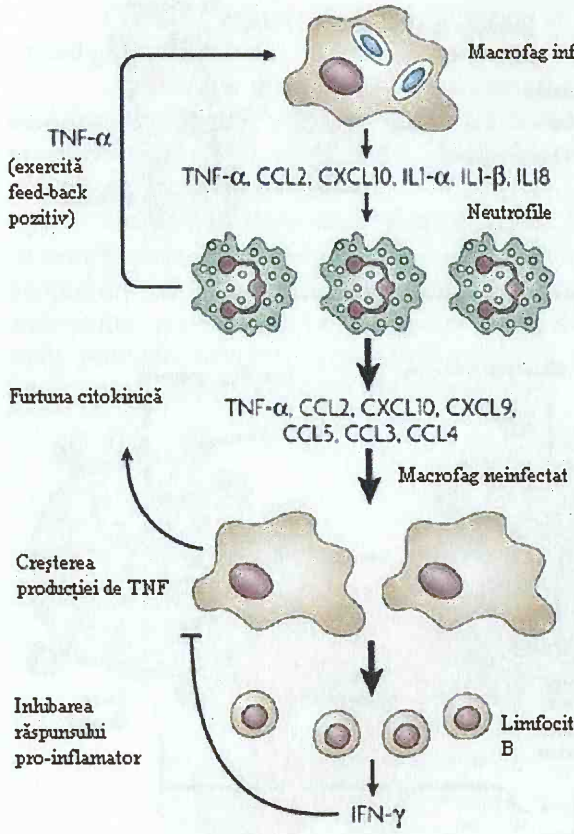


Fig. 255. Cascada citokinelor declanşată de macrofagele infectate cu *M. tuberculosis*, mediată de TNF-α. În condiţii experimentale s-a observat afluxul neutrofilelor în etapele iniţiale ale formării granulomului, care însă nu a putut fi demonstrat *in vivo*. Chemokinele eliberate sunt atractante pentru limfocite. Ele eliberează IFNγ care inhibă reacţia inflamatorie (Russel, 2007).

Asocierea granulomului epitelioid cu reacţia de HSÎ, se explică prin numărul mare de limfocite T la periferia structurii granulomatoase.

După *contactul primar* cu antigenele de *M. tuberculosis*, organismul dobândeşte o anumită rezistenţă, reflectată prin creşterea capacităţii de a localiza bacilul tuberculos şi de a limita diseminarea limfatică, pe seama activării IMC, a creşterii capacităţii monocitelor de a limita multiplicarea bacililor şi chiar de a-i distruge. Gazda devine hipersensibilă la bacilul tuberculos (reacţia pozitivă la tuberculină). Hipersensibilitatea este rezultatul contactului cu bacilii întregi sau cu amestecul proteic al tuberculinei, în asociaţie cu lipidele parietale. Hipersensibilitatea şi rezistenţa sunt aspecte distincte ale reactivităţii mediate celular.

Reactivitatea organismului faţă de *M. tuberculosis* se evaluează prin *testul tuberculinei*. Pentru acest test se foloseşte preparatul vechi (germ. *alt* = engl. *old tuberculin*) sau derivatul proteic purificat (PPD). *Alt tuberculin* este filtratul acelular, concentrat, al culturii de *M. tuberculosis* în mediu lichid, de 6 săptămâni. Este un amestec de proteine, la care se adaugă o varietate de compuşi celulari şi din mediul de creştere. PPD se obţine prin fracţionarea chimică a preparatului *alt tuberculin* şi este standardizată din punctul de vedere al reactivităţii biologice, exprimată în unităţi de tuberculină.

Diagnostic. Testul pozitiv la tuberculină nu este dovada tuberculozei active. La un individ fără contact anterior cu antigenele de *M. tuberculosis*, reacţia la tuberculină este absentă. La persoanele care au parcurs etapa infecţiei primare, la locul injectării tuberculinei se produce indurație, edem şi eritem în 24—48 de ore, cu reacţie inflamatorie foarte intensă, chiar cu necroză centrală. Testul reacţiei la tuberculină se citeşte la 48–72 de ore şi este considerat pozitiv dacă injectarea a 5 unităţi de tuberculină produce o indurație cu diametrul de cel puţin 10 mm (o unitate de tuberculină este activitatea conţinută într-o greutate specificată, într-un tampon specific). Testul pozitiv persistă câteva zile.

Testul la tuberculină devine pozitiv la 4–6 săptămâni după infecţie sau după vaccinare. Tuberculina are efecte negative la pacienţii tuberculoşi datorită activării reacţiei de hipersensibilitate celulară, la cei cu infecţie rujeolică, cu boala Hodgkin, la pacienţii SIDA şi la cei imunosupresaţi.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După tratamentul cu izoniazidă, testul la tuberculină poate deveni negativ. Testul se negativează numai după eliminarea bacililor din organism. După vaccinarea BCG, testul devine negativ la 3–7 ani.

Evidenţierea bacilului tuberculos este dovada prezumptivă a existenţei procesului infecţios. Probele analizate sunt sputa, spălătura gastrică, urina, fluidul pleural, LCR, lichidul articular, materialul biopsic, sângele. Frotiul din spută din exsudatul pleural se colorează după metoda Ziehl-Neelsen.

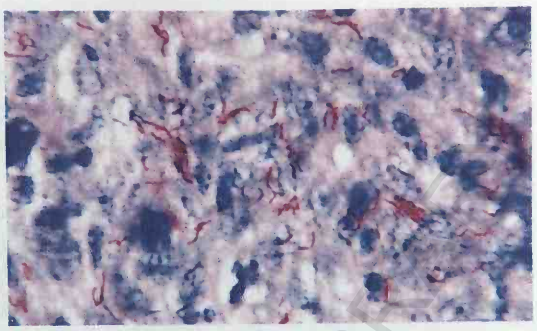


Fig. 256. Frotiu colorat Ziehl Neelsen pe care se observă BAAR colorați în roşu şi grupați în corzi (http://img.medscape.com/fullsize/migrated).

Lichidul de spălătură gastrică şi urina nu se recomandă pentru colorare, deoarece conţin micobacterii saprobionte care dau colorație fals pozitivă. Microscopia cu fluorocromi (auramină, rodamină) este mai sensibilă decât colorația Ziehl-Neelsen.

Cultivarea pe mediul lichid selectiv este o metodă sensibilă pentru diagnosticul de certitudine al procesului infecţios. În paralel se inoculează mediul Lowenstein-Jensen. Mediile inoculate se incubează la 35–37°C, pentru 8 săptămâni (fig. 257, 258).

Fig. 257. Aspectul coloniilor de *M. tuberculosis* pe mediu Lowenstein – Jensen (http://www.cosmosbiomedical.com/education/bacteriology/TB).

Fig. 258. Aspectul culturii unei micobacterii cromogene pe mediu L-J – *M. phlei*

Metodele clasice de identificare au în vedere rata de creştere, morfologia coloniilor, pigmentația, profilul biochimic şi necesită 6-8 săptămâni. Tulpinile fotocromogene produc pigment la lumină, cele scotocromogene, la întuneric, iar cele necromogene nu se pigmentează.

Metodele moleculare de identificare sunt rapide şi sensibile. Probele de ADN care codifică ARNr se folosesc pentru metoda hibridării.

Metoda HPLC se bazează pe identificarea acizilor micolici, variabili de la o specie la alta.

Metoda PCR se foloseşte pentru detectarea ADN de *M. tuberculosis* în probele clinice.

În 1927, Calmette şi Guerin, după numeroase pasaje, au obținut o tulpină atenuată de *M. bovis*, folosită ca vaccin BCG, cu o bună eficienţă protectoare pentru prevenirea tuberculozei miliare la copii. La tulpina mutantă din BCG lipsesc 129 de gene, comparativ cu tulpinile virulente de *M. tuberculosis*, considerate ca gene esențiale pentru virulență.

Pentru identificarea bacteriilor acido-alcoolo-rezistente se foloseşte metoda colorației Ziehl-Neelsen. Pe frotiurile din spută sau din țesut, *Mycobacterium* se evidențiază după colorare cu fluorocromi (auramină sau rodamină).

Tratamentul constă în administrarea chimioterapiei specifice. Mutantele rezistente apar cu o frecvență relativ mare: $1/10^6$–10^8 celule sunt mutante spontane rezistente la medicația de primă linie (izoniazida şi rifampin). Medicamentele administrate singure selectează foarte repede mutantele rezistente. De aceea, tratamentul se face cu combinații de medicamente, cu o rată de vindecare de peste 95%.

M. avium complex (MAC), denumit şi *M. intracellulare* (MAI) este cel mai comun agent infecţios oportunist la pacienţii imunocompromişi (SIDA), după ce numărul limfocitelor TCD_4 scade sub 100/μL. Temperatura optimă de creştere este de 41°C. Tulpinile MAC sunt ubicuitare în mediile naturale: fiind izolate din sol, ape, alimente, animale, inclusiv de la păsări.

M. leprae a fost descris de Hansen (1873). Bacilii sunt acidorezistenţi şi cresc în cordoane paralele sau în aglomerări globulare. La pacienţii cu lepră lepromatoasă, *M. leprae* se găseşte în raclajul tegumentar, al mucoaselor, în celulele endoteliale ale vaselor şi în celulele mononucleare. Leziunile sunt localizate în ţesuturile reci: tegument, nervi superficiali, faringe, laringe, globul ocular, testicule. Tulburările nervoase se datorează infiltrării filetelor nervoase cu monocite şi limfocite, componente ale granulomului, şi constau în tulburări de sensibilitate, ulcere trofice, resorbţie osoasă, scurtarea degetelor.

Infecţia leproasă se manifestă cu un spectru larg de variaţie a amplitudinii leziunilor, între cele două forme extreme:

- *lepra leproidă,* cu evoluţie gravă, asociată cu leziuni teumentare nodulare multiple, un număr enorm de bacili de *M. leprae* în granuloamele lepromatoase (peste 10^{10}/g de ţesut) şi implicare sistemică a nervilor. Testul la lepromină este negativ sau slab pozitiv. Proliferarea bacililor produce leziuni tegumentare distribuite difuz sau localizate în noduli. Granuloamele sunt formate din macrofage inactive, gigante, provenite prin fuziune, încărcate cu bacili. Lipseşte infiltratul limfocitar, ceea ce dovedeşte absenţa IMC. Tegumentul este infiltrat cu celule T supresoare. S-a demonstrat *anergia celulelor T*, cu specificitate faţă de antigenele bacilului leprozei. Anergia IMC este explicată prin predispoziţia genetică, prin deleţia clonală a celulelor T specifice faţă de antigenele de *M. leprae* şi prin funcţia inhibitorie a celulelor Ts specifice. Macrofagele sunt pline cu bacili şi chiar după chimioterapie prelungită, aceştia sunt eliminaţi lent.
- *lepra tuberculoidă*, cu evoluţie favorabilă, neprogresivă, este o maladie localizată, cu granuloame tegumentare bine organizate, cu macrofage cu citoplasma spumoasă, celule epitelioide şi celule gigante Langhans active, care omoară şi digeră bacilii de *M. leprae.* Infiltratul limfocitar al granulomului este intens, cu predominanţa limfocitelor TCD_4, care secretă IFNγ. Interferonul activează macrofagele din focar, care devin astfel capabile să inhibe creşterea şi diviziunea celulelor de *M leprae*. La periferia granulomului se găsesc limfocite TCD_8. Testul la lepromină este pozitiv, iar IMC este funcţională. Leziunile nervilor se datorează proliferării bacililor şi răspunsului IMC în situsuri adiacente filetelor nervoase.

Infecţia se transmite, probabil, datorită contactului prelungit al copilului mic, cu persoanele care elimină un număr mare de bacili.

Bibliografie selectivă

1. http://www.med.cmu.ac.th/dept/pediatrics/06-interest-cases/ic-8-nocardia/case3.htm
2. Hastings Robert C., Gillis P. Thomas, Krahenbull James L. and Franzblau Scott G. 1988. Leprosy. Clin. Microbiol. Rev. 1, 3.
3. http://img.medscape.com/fullsize/migrated/461/965/
4. http://www.asm.org/division/c/photo/nocard1.JPG)
5. http://www.cosmosbiomedical.com/education/bacteriology/TB
6. http://www.flickr.com/photos/euthman/2111203428/)
7. http://www.pathologyatlas.ro/tuberculoza-pulmonara-morfopatologie-aparat-respirator.php
8. http://www1.ams.cmu.ac.th/depts/clinmcrb/CMBwebsite
9. Russell D. G. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? Nature Reviews Microbiology 5, 39-47
10. Ulrichs T., Kaufmann S. H. E. 2002. Mycobacterial persistence and immunity. Frontiers in Bioscience 7:458–469.

BCU "CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY"

11. INFECŢII PRODUSE DE BACTERII ANAEROBE REZIDENTE ÎN MICROBIOTA NORMALĂ

Bacteriile anaerobe fac parte din *microbiota normală* şi se găsesc pe tegument, pe suprafaţa mucoasei orale şi a tractului gastrointestinal. Unele specii sunt aerotolerante şi cresc chiar în aerul atmosferic, dar au metabolism anaerob. Bacteriile obligat anaerobe nu au sisteme moleculare protectoare faţă de radicalii toxici ai O_2: nu au SOD şi nici catalază şi se izolează doar rareori din focarele infecţioase umane. Cele mai multe infecţii anaerobe la om sunt provocate de bacterii *anaerobe* care tolerează concentraţii mici de O_2 în mediu.

Tabelul 26.

Bacterii anaerobe, altele decât genul *Clostridium*, întâlnite în patologia umană (Brook, 2008).

Specii microbiene anaerobe	Surse de izolare
Coci Gram pozitivi	
Peptostreptococcus spp.	Tractul respirator, infecţii intra-abdominale, infecţii subcutanate
Streptococi microaerofili	Sinuzite, abcese craniene
Bacili Gram pozitivi- nesporulaţi	
Actinomyces spp.	Abcese intracraniene, pneumonii, infecţii ORL
Propionibacterium acnes	Infecţii cardiace şi intracraniene
Bifidobacterium spp.	Otite
Bacili Gram negativi	
Bacteroides fragilis grup (Bacteroides fragilis, B. thetaiotamicron)	Infecţii intra-abdominale, infecţii ale tractului genital la femei, infecţii neonatale, sepsis
Prevotella spp., Porphyromonas spp.	Infecţii orofaciale, pneumonii, peritonite
Prevotella oralis	Infecţii orofaciale
Prevotella B. oris-buccae	Infecţii orofaciale şi intra-abdominale
P. bivia, P. disiens, Fusobacterium spp.	Infecţii ale tractului genital la femei
F. nucleatum	Infecţii orofaciale, respiratorii, abcese intracraniene
F. necrophorum	Pneumonii.

Fiind bacterii componente ale microbiotei normale, infecţia se produce atunci când anaerobii sau alte specii ale microbiotei contaminează situsuri care în mod normal sunt sterile.

Procesele infecţioase provocate de bacteriile anaerobe sunt de obicei polimicrobiene, anaerobii fiind asociaţi cu anaerobi facultativi (tabelul 26). De exemplu, într-o infecţie abdominală (o peritonită), *E. coli* consumă repede O_2 disponibil şi îşi modifică metabolismul devenind anaerobă. Mediul anaerob cu potenţial redox scăzut favorizează creşterea bacteriilor anaerobe.

Bacterii Gram negative

Speciile de *Bacteroides* formează un grup mare de bacili Gram negativi sau cocobacili (fig. 259). Multe specii ale genului *Bacteroides* au fost reclasificate în g. *Prevotella* şi *Porphyromonas*.

B. fragilis formează populaţii dense în colon (10^{11} celule/gram) şi se izolează din infecţiile supurative produse prin contaminarea cu conţinut intestinal (peritonita datorată leziunilor apendicelui sau ale colonului) (Finegold şi colab., 1983).

În infecţiile intraabdominale, speciile de *Bacteroides* sp. sunt asociate cu coci anaerobi (*Peptostreptococcus* sp.), cu bacili anaerobi Gram pozitivi (*Clostridium* sp.) şi cu facultativ anarobi din microbiota normală.

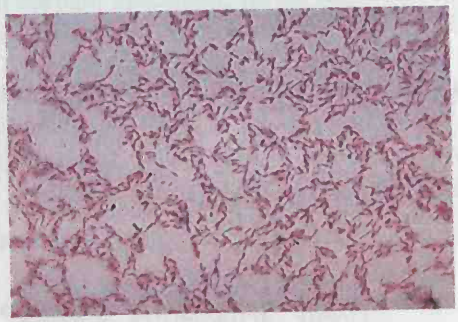


Fig. 259. Bacteroides spp. pe frotiuri colorate Gram (www.answers.com/topic/bacteroides).

Fig. 260. Cultura pigmentară de *Prevotella melanogenica* pe geloză sânge (http://pemburumikroba.blogspot.com//kuman-anaerob) şi morfologia pe frotiu colorat Gram (http://web.inonu.edu.tr/~bdurmaz/Prevotella.htm).

Grupul *B. fragilis* se deosebeşte de ceilalţi bacili Gram negativi anaerobi prin capacitatea de a creşte pe mediu cu concentraţii ridicate (20%) de bilă, deoarece intervine în deconjugarea acizilor biliari primari. Este catalază şi indol pozitiv, rezistent la kanamicină, vancomocină şi colistin (Tudor şi colab., 1999).

Bacilii Gram negativi anaerobi din genurile *Prevotella* (fig. 260) şi *Porphyromonas* formează colonii pigmentate cu fluorescenţă roşie în UV, sunt sensibili la săruri biliare, vancomicină şi colistin, necesită pentru creştere hemină şi vitamina K şi sunt catalază negativi. *Prevotella sp.* fermentează zaharurile, spre deosebire de *Porphyromonas* sp. *Prevotella* cuprinde mai multe specii: *P. bividia, P. buccae, P. denticola, P disiens, P. intermedia, P. melaninogenica, P. oralis. Porphyromonas: P. asaccharolytica, P. endodontalis, P. gingivalis*. Aceste microorganisme au fost izolate din infecţii ale tractului respirator, subcutanate, aspirate bronşice, otite cronice, sinuzite şi abcese ale cavităţii bucale.

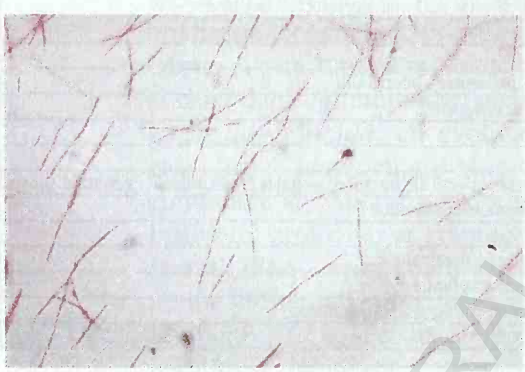


Fig. 261. Fusobacterium spp. Morfologia pe frotiul colorat Gram (www.asm.org/Division/c/Gramneg.htm).

Speciile de *Fusobacterium* sunt bacterii Gram negative pleomorfe (fig. 261), cresc pe medii cu 20% bilă, sunt catalază negative, sensibile la kanamicină, colistin şi penicilină, dar rezistente la vancomicină. Speciile cel mai adesea întâlnite în clinică sunt *F. necrophorum* şi *F. nucleatum*. *F. nucleatum* produce indol şi lipază, nu reduce nitraţii. *F. necrophorum* produce colonii β- hemolitice pe geloză sânge. Cele mai multe specii produc acid butiric şi convertesc treonina în acid propionic. Se izolează din infecţiile anaerobe polimicrobiene, dar în osteomielită pot fi în cultură pură.

Patogenitatea bacililor Gram negativi anaerobi este condiţionată de prezenţa capsulei polizaharidice (la *B. fragilis* şi *P. melanogenica),* a pililor cu rol în aderenţă şi colonizare (la *B. fragilis, B. ovatus* şi *Porphyromonas gingivalis*), a endotoxinelor cu rol în apariţia infecţiilor supurative, a enzimelor histolitice de tipul hialuronidazei, colagenazei, neuraminidazei, heparinazei, fibrinolizinei (produse de speciile de *Bacteroides)*, a fosfolipazei A (produsă de *Prevotella melaninogenica* şi *P. intermedia*), a hemaglutininelor (produse de *Porphyromonas gingivalis*) sau a enzimelor cu rol în protejarea bacteriilor faţă de mecanismele de apărare ale gazdei (superoxid dismutaza) şi a acidului succinic, care inhibă fagocitoza.

Cocii Gram negativi anaerobi sunt incluşi în genul *Veillonella* (cu morfologie asemănătoare cu *Neisseria*) (fig. 262), *Acidaminococcus* şi *Megasphaera*, fiind izolaţi din bacteriemii, infecţii ginecologice, abcese şi infecţii ale plăgilor, endocardite şi sinuzite.

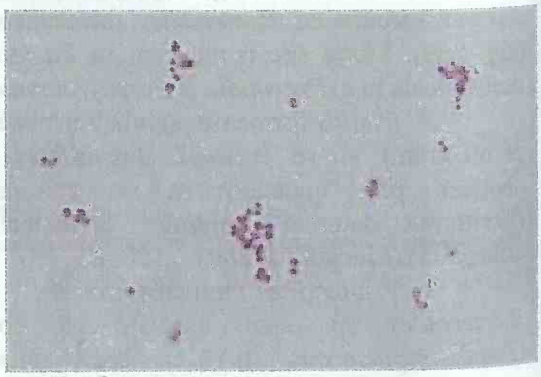


Fig. 262. Veillonella sp. Morfologia celulelor pe frontiul colorat Gram (www.atsu.edu/.../chamberlain/Website/gallery.htm).

Bacterii Gram pozitive

Genul *Actinomyces* cuprinde bacili Gram pozitivi ramificaţi sau filamentoşi nesporulaţi, imobili microaerofili sau strict anaerobi, catalază, indol,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

urează, lipază și DN-ază negativi, care formează pe geloză sânge colonii mari, pigmentate, rugoase, aderente la mediu, ce apar după 6–21 de zile de incubare. Cele mai frecvente specii componente ale microbiotei orofaringiene sunt: *A. israelii, A. naeslundii, A. viscosus, A. odontolyticus* și *A. meyeri.*

Actinomyces israelii și *A. naeslundii* sunt componente minore ale microbiotei orale și a tractului digestiv, care pot iniția un proces infecțios cronic, supurativ, granulomatos, fiind izolate din abcese intracraniene, mastoidite cronice, pneumonii și peritonite. *Actinomyces israelii* produce actinomicoza. Filamentele pot fi scurte și măciucate sau lungi, subțiri, ramificate sau neramificate. Este un anaerob aerotolerant. Pe frotiul din leziunea granulomatoasă piogenă se disting granule formate din componente celulare ale țesutului și microcolonii bacteriene. În granulomul infecțios se găsesc și alte bacterii din microbiota orală: *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Eikenela corodens, Capnocytophaga* etc. Procesul infecțios este inițiat în zonele traumatizate ale mucoaselor. *A. israelii* este facultativ anaerob și crește în atmosferă cu CO_2.

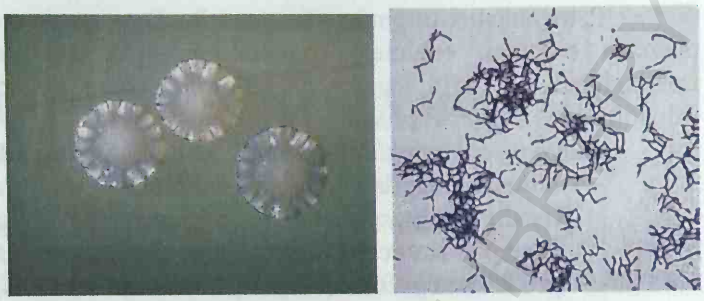


Fig. 263. Actinomyces spp. Morfologia coloniilor (stânga) și a celulelor pe frotiul colorat Gram (dreapta) (http://commons, wikitovet.blogspot.com/2006_12_01_archive.html).

Pentru *diagnostic*, se examinează puroiul din leziunile granulomatoase pentru prezența structurilor granulare. Granulele sunt tari, lobulate, alcătuite din macrofage și alte componente tisulare, filamente bacteriene măciucate corineforme și mici concrețiuni de sulf elementar, formate prin oxidarea H_2S rezultat din metabolismul aminoacizilor cu sulf. *A. israelii* crește pe bulion cu tioglicolat incubat anaerob sau în atmosferă cu CO_2. *A. israelii* este un component al microbiotei endogene și nu poate fi eliminat. Persoanele care fac infecții recurente trebuie să primească preventiv tratament cu penicilină, în special înainte de extracțiile dentare.

Genul *Mobiluncus* cuprinde bacili strict anaerobi, mobili, curbați, care pot apărea adesea colorați Gram negativ. Sunt agenți etiologici ai vaginitelor, adesea în asociere cu alte microorganisme anaerobe sau cu *Gardnerella spp.*, sunt sensibili la ampicilină sau eritromicină.

Genul *Lactobacillus*, componentă majoră a microbiotei normale vaginale, produce acid lactic care menține valoarea acidă a pH local. Infecțiile sunt foarte rare.

Fig. 264. Celule pleomorfe de *Propionibacterium* http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/Propionibacterium_acnes.jpg

Din grupul corinebacteriilor anaerobe fac parte speciile de *Propionibacterium*, unele dintre ele rezidente pe tegument. *Propionibacterium* sp. (acidul propionic este unul dintre produsele finale ale metabolismului), din microbiota normală a tegumentului, produce infecții dacă este introdus în țesuturi odată cu materialele plastice din catetere și este implicat în infecția *acneică*. Celulele sunt pleomorfe: bacili curbați, măciucați, forme lungi colorate neuniform, cocobacili sau forme sferice (fig. 264). *P. acnes* este aerotolerant (crește în prezența O_2 la presiunea atmosferică). Procesul patologic al acneii este mediat de lipazele extracelulare care scindează acizii grași din lipidele tegumentare. *P. acnes* utilizează acizii grași ca sursă de carbon și energie, se multiplică în glandele sebacee și determină procesul inflamator cu hiperemie și aflux de leucocite, producând leziunile eritematoase tegumentare.

Genul *Eubacterium* cuprinde specii recunoscute ca agenți ai leziunilor periodontale, în infecțiile asociate cu dispozitive intrauterine, respiratorii mixte, de plagă și în bacteriemii la pacienții imunodeprimați.

Cocii Gram pozitivi anaerobi cuprind specii de *Peptococcus, Peptostreptococcus* şi tulpini de streptococi microaerofili, catalază – pozitive sau negative, fermentative, izolate din infecţii ale cavităţii bucale, tractului gastro-intestinal, abcese subcutanate şi din infecţii pulmonare.

Patogenitatea tulpinilor din genurile *Peptostreptococcus* şi *Peptococcus* este determinată de prezenţa capsulei, enzimelor proteolitice şi a unor proteine de suprafaţă care inactivează imunoglubulinele, prin legarea de lanţurile uşoare ale acestora, de unde numele de proteină L (identificată la *Peptostreptococcus magnus*).

Diagnosticul infecţiilor anaerobe se bazează pe următoarele aspecte:

- mirosul greu, datorat produselor metabolismului anaerob (acizi graşi cu catenă scurtă);
- localizarea proceselor infecţioase anaerobe în vecinătatea unei structuri mucoase, deoarece anaerobii sunt componente ale microbiotei normale şi invazivitatea este minimă;
- producerea gazelor (CO_2, H_2) în focarul infecţios;
- cultivarea agentului infecţios în condiţii aerobe nu este urmată de creştere.

Tratamentul infecţiilor cu bacterii anaerobe presupune antibioterapie (tabelul 27), asociată cu drenajul chirurgical al colecţiei purulente închise.

Tabelul. 27.

Antibiotice recomandate în cazul infecţiilor cu bacterii anaerobe.

Coci Gram pozitivi anaerobi	Coci Gram negativi anaerobi	Bacili Gram negativi anaerobi	Bacili Gram pozitivi anaerobi
penicilină, cefalosporine, clindamicină, vancomicină	penicilină, cefalosporine, cloramfenicol, clindamicină, vancomicină, imipenem, sparfloxacină	penicilină La tulpinile producătoare de penicilinaza: metronidazol, cloramfenicol, clindamicină, imipenem, cefoxitin şi combinaţii cu inhibitori de β-lactamaze (amoxicilină – clavulanat, ampicilina – sulbactam, ticarcilina – clavulanat)	penicilină, cefalosporine, eritromicină, lincomicină, clindamicină, vancomicină, rifampicină, sparfloxacină
	Nu se folosesc ciprofloxacina şi metronidazolul.	Nu sunt eficiente aminoglicozidele, cotrimoxazolul, cefalosporinele de generaţia III – a, qinolonele şi monobactamii.	Nu se recomandă metronidazolul (majoritatea bacililor sunt rezistenţi).

Bibliografie selectivă

Finegold S. M., Sutter V. L., Mathisen G. E. 1983. *Normal indigenous intestinal microbiota*,. In D. J. Hentges (ed.), *Human intestinal micromicrobiota in health and disease*.Academic Press, New York. pp. 3–31

Gram(http://web.inonu.edu.tr/~bdurmaz/Prevotella.htm

http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/strandwi_phi;

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Actinomyces_spp_01.jpg

http://pemburumikroba.blogspot.com//kuman-anaerob

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/Propionibacterium_acnes.jpg

tovet.blogspot.com/2006_12_01_archive.html

http://web.inonu.edu.tr/~bdurmaz/Prevotella.htm

http://www.biolib.cz/en/image/id27230

Tudor A., Dragan M. 1999. Boli Infecţioase- Curs pentru studenţii facultăţilor de stomatologie, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, ISBN 973-30-5575-1, pp. 365–383

www.asm.org/Division/c/Gramneg.htm

www.atsu.edu/.../chamberlain/Website/gallery.htm.

BCU IAŞI "GHEORGHE ASACHI" UNIVERSITY LIBRARY

12. BACTERII SPIRALATE DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ

12.1. Familia Vibrionaceae

Familia *Vibrionaceae* cuprinde patru genuri: *Vibrio, Photobacterium, Aeromonas* şi *Plesiomonas.*

La om, vibrionii produc atât infecţii intestinale, cât şi extraintestinale (Bergey's, 2005). Dintre membrii acestei familii cei mai importanţi aparţin genului *Vibrio*, remarcabili prin potenţialul lor epidemic, specia *V. cholerae* fiind agentul patogen al holerei.

12.1.1. Genul *Vibrio*

Genul *Vibrio* include bacili Gram negativi, drepţi sau curbaţi, nesporulaţi, în general necapsulaţi, mobili în medii lichide datorită flagelilor (mono- sau lofotrihi) înveliţi într-o membrană tecală ce se continuă cu membrana externă a peretelui celular. Unele specii, pe medii solide, pot sintetiza flageli peritrihi. Sunt bacili facultativ anaerobi, cu metabolism chemoorganotrof fermentativ şi oxidativ, cresc în medii ce conţin D-glucoză şi clorură de amoniu. Cu puţine excepţii, fermentează glucoza fără producere de gaz. Sunt oxidazo-pozitivi.

Membrii genului *Vibrio* sunt sensibili la acţiunea 2,4-diamino-6,7-diizopropil pteridina (agentul vibriostatic O/129) (caracter de diferenţiere faţă de genul *Aeromonas*). Raportul guanină/citozină din ADN se situează între 38–51%.

Membrii genului *Vibrio,* indigeni ai apelor estuarine, marine sau salmastre necesită concentraţii de cationi (mai ales Na^+, K^+, Mg^{2+}) mult mai mari decât microorganismele „terestre". Cele mai multe specii sunt halofile. De aceea cresc foarte greu în medii ce conţin sub 0,5% clorură de sodiu. Chiar speciile cu ascendenţă în mediul acvatic marin (*V. cholerae* şi *V. mimicus*), adaptate însă la intestinul uman (concentraţie locală NaCl 0,85%) şi considerate singurele specii „terestre", necesită pentru o bună creştere, 1%–3% NaCl. Concentraţia optimă şi toleranţa maximă la clorura de sodiu diferă în funcţie de specie. Agarul nutritiv din a cărui compoziţie a fost exclusă clorura de sodiu, îmbogăţit cu sânge sau bulion de cord-creier, permite creşterea, dat fiind aportul de clorură de sodiu din substratul adăugat. Majoritatea vibrionilor cresc între pH 5,6 şi 9,6 cu un optimum de 7,6—8,6. Comparativ cu alţi bacili Gram negativi, au rate de creştere şi de dezvoltare mult mai rapide. Speciile patogene pentru om cresc şi se dezvoltă bine între 30–37°C. Nu cresc la +4°C, dar pot supravieţui la această temperatură în stare dormantă (necultivabilă) devenind din nou cutivabili prin trecere pe un organism viu uman sau animal.

Epidemiologia şi Microbiologia medicală rămân interesate mai ales de speciile patogene pentru om.

În ultimile două decenii, la categoria tulpinilor de *V.cholerae* holerigene s-au adăugat şi unele serogrupuri non O:1/non O139, purtătoare de gene pentru toxina holerică şi epidemiogene, responsabile de epidemii de holeră în diferite zone ale globului.

Alte specii de vibrioni:

V. mimicus (face trecerea între vibrionii nonhalofili tip *V. cholerae* şi vibrionii halofili) produce diaree „*cholera-like*";

Vibrioni halofili

V. mimicus produce diaree „*cholera-like*";

V. parahemolyticus determină gastroenterita, toxiinfecţii alimentare, infecţii ale ţesuturilor moi;

V. fluvialis, V. holissae, V. furnissi determină diaree;

V. alginolyticus produce infecţii ale ţesuturilor moi;

V. vulnificus – infecţii, septicemii la alcoolici, la bolnavii cu hepatite cronice.

Caracterizarea morfologică, biochimică şi genetică a vibrionului holeric

Principala specie patogenă pentru om, *V. cholerae* sau *V. comma*, cum a fost denumită în 1884 de cel ce a pus-o în evidenţă şi a considerat-o agentul etiologic al holerei (R. Koch), a fost divizată în vibrioni holerici de grup O:1 şi vibrioni holerici de grup non O:1 (>200). Deosebirea are la bază structura antigenică, antigenul lipopolizaharidic somatic O, specific fiecărui grup.

Cele holerigene determină holera şi se încadrează în serogrupurile O:1 şi O:139, în timp ce alte serogrupuri (non O:1, non:O139) produc, diaree *cholera-like,* gastroenterite, infecţii ale ţesuturilor moi; serogrupurile holerigene sintetizează toxina holerică, răspunzătoare de simptomele grave din infecţia holerică, având în acelaşi timp o mare capacitate de răspândire în mediul extern (sunt înalt epidemiogene). Trebuie adăugat că tulpinile de *V. cholerae* holerigene serogrup O139 pot fi răspunzătoare şi de cazuri de septicemii, care se explică prin înalta invazivitate a acestor tulpini datorită prezenţei capsulei.

Tulpinile cu specificitate somatică O:1 pot aparţine celor trei serotipuri cunoscute, în funcţie de ponderea cantitativă a unor fracţiuni antigenice de natură proteică notate de la A la M (importante pentru diagostic fiind de regulă numai A, B şi C) constituente ale antigenului somatic O:1: Inaba (prezintă antigene A şi C), Ogawa (are antigene A şi B) şi Hikojima (prezintă antigene A, B şi C).

Diagnosticul/caracterizarea unei tulpini de *V. cholerae* O:1şi implicit denumirea corectă va cuprinde:

- specia: *Vibrio cholerae*;
- serogrupul: O:1 sau non O:1;
- serotipul: Inaba, Ogawa, Hikojima, aplicabil doar pentru serogrupul O:1;
- biotipul: cholerae (clasic) sau ElTor, aplicabil de asemenea doar pentru serogrupul O:1.

De menţionat că separarea în cele două biotipuri, sau mai nou, biovarietăţi, nu are la bază structura antigenică, ci unele caractere biochimice, fenotipice: reacţia Voges-Proskauer, aglutinarea hematiilor de găină, prezenţa hemolizinei, precum şi sensibilitatea/rezistenţa la polimixină şi la acţiunea fagului IV Mukerjee (setul de fagi biotip clasic).

Până nu demult, doar serogrupului O:1 i se recunoscuse capacitatea holerigenă, ceea ce presupunea:

- prezenţa specificităţii O:1;
- prezenţa fracţiunilor antigenului somatic O definitorii pentru cele trei serotipuri;
- prezenţa caracterelor fenotipice caracteristice biotipului.

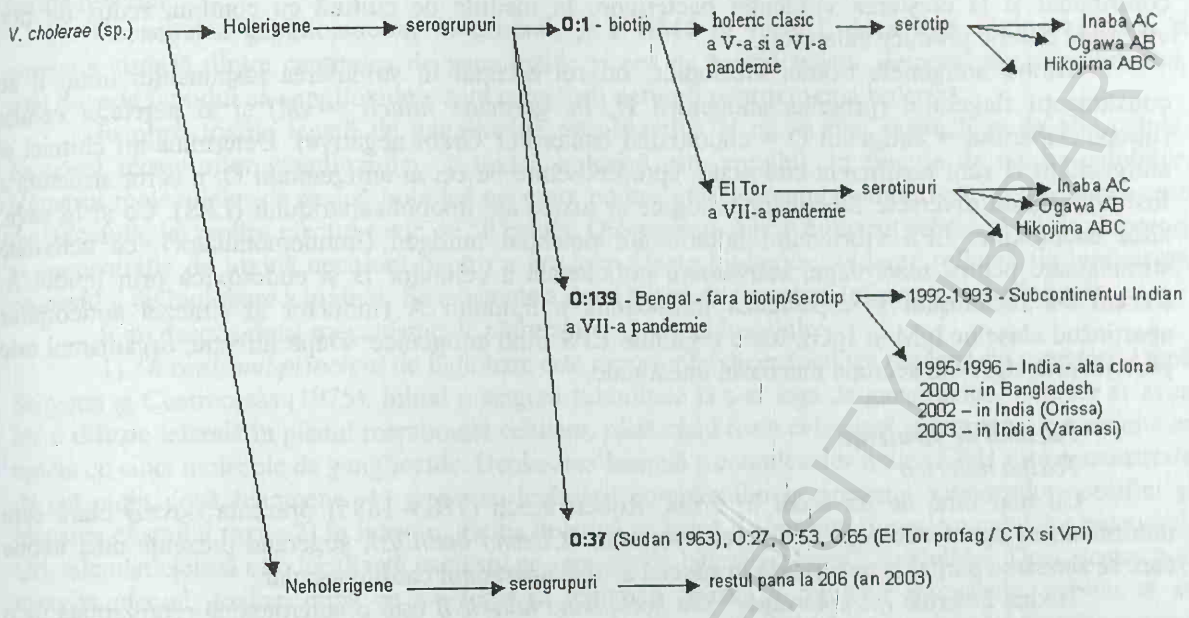
Din 1992 însă, emergenţa unei noi tulpini holerigene cu acelaşi potenţial epidemic, lipsită de specificitatea O:1, aparţinând grupului mare şi heterogen non O:1 (serogrupul O:139 Bengal), s-a adăugat grupului O:1. Serogrupului O:139 Bengal i s-a recunoscut capacitatea holerigenă, prezenţa lui în teritoriu impunând notificarea internaţională (OMS) (fig. 265).

Holera poate fi asimptomatică (75% din cazuri) şi simptomatică (25%). Cazurile clinice se pot manifesta sub formă de tulburări diareice uşoare (18% din cazuri), moderată (5% din cazuri) şi gravă (necesită obligatoriu spitalizare) cu scaune numeroase apoase până la aspect riziform, vomă, crampe abdominale, deshidratare masivă, şoc hipovolemic şi chiar exitus (prin deshidratare).

Din punct de vedere clinic, cazurile de holeră produsă de tulpinile *V.cholerae* O:1 şi O:139 au aceeaşi simptomatologie clinică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Clasificarea* revizuita a tulpinilor de *V. cholerae* holerigene si neholerigene



*Laborator Vibrio – Institutul Cantacuzino

Fig. 265. Clasificarea tulpinilor de *V.cholerae* holerigene şi nonholerigene.

Grupul non O:1 cuprinde tulpini clasificabile dupa specificităţile antigenice „O". Anterior au fost desemnaţi cu denumirea generică de vibrioni neholerigeni (*non cholerae vibrios* = NCV) sau non-aglutinabili cu serul bivalent de grup O:1 (*non aglutinable vibrios* = NAG).

În ceea ce priveşte habitatul vibrionului holeric, există mai multe surse care pot constitui rezervoare de infecţie: omul bolnav cu forme clinice aparente sau inaparente (eliminarea vibrionilor prin scaune şi vomă), mediile acvatice marine şi estuarine în care vibrionii holerici sunt indigeni, asociaţi cu organisme vii (zooplanctonice, crustacee) sau plante acvatice.

Poarta de intrare este digestivă, vibrionii fiind introduşi în organism pe cale orală, odată cu apa, cu alimentele contaminate sau prin intermediul mâinilor murdare.

Din punct de vedere morfologic, vibrionii holerici sunt bacili nesporulaţi, Gram negativi, cu dimensiuni medii de 1,5–2 / 0,3–0,4 μm, cu capete rotunjite sau uşor aplatizate, monotrihi (fig. 266). Lungimea flagelului terminal polar depăşeşte de 4-5 ori lungimea celulei.

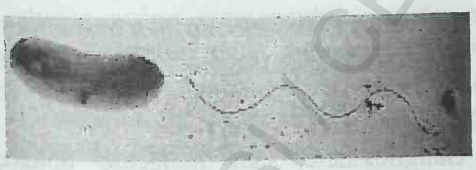


Fig. 266. Imagine la microscopul electronic, metoda coloraţiei negative, a vibrionului holeric. Se observă flagelul polar. (http://www.tjclarkinc.com/bacterial_diseases/cholera_vibrio_cholerae.htm).

Vibrionii holerici se dezvoltă cu uşurinţă pe medii simple (apa peptonată, bulion, agar nutritiv, gelatină). În medii lichide tulbură uniform mediul, cu creştere redusă după 6–8 ore la 37°C şi intensă după 18–29 ore; uneori se poate forma un depozit pe seama peliculei formate la suprafaţa mediului; capacitatea de a se dezvolta la suprafaţă, cu sau fără peliculă, la pH alcalin (9,2), mai rapid decât alte bacterii aerobe ale microbiotei intestinale, a permis selectarea apei peptonate alcaline ca mediu de îmbogăţire. Sunt sensibili la acţiunea pH mai mic de 6,4 (în mediile ce conţin zaharuri fermentabile, prin păstrarea îndelungată a culturii, se produce „autosterilizarea"). Pe agar nutritiv (18–20 ore la 37°C) creşte sub formă de colonii rotunde cu suprafaţa uşor bombată, convexă, margini regulate, translucide, fără iridescenţă la examenul în lumina oblică (10–12 ore) şi opace după 18–20 ore la 37°C. Lichefiază gelatina (48 ore), tardiv (7 zile) şi mediul cu ser de bou. Se dezvoltă în prezenţa

sărurilor biliare, sulfitului, teluritului de potasiu, substanțe utilizate în mediile uzuale selective, în scopul izolării. Prezența fierului în mediul de cultură (culturi submerse) favorizează creșterea, contribuind și la creșterea virulenței bacteriene. În mediile de cultură cu conținut redus de fier, vibrionul holeric produce siderofori.

Dintre antigenele celulei vibrionice, un rol esențial în stimularea răspunsului imun îl au constituenții flagelului (proteina antigenică H, lb. germană *hauch* = văl) și ai peretelui celular (lipopolizaharidul = antigenul O = endotoxina bacteriilor Gram negative). Determinanții chimici ai antigenității H sunt insuficient cunoscuți, spre deosebire de cei ai antigenității O, a căror structură a fost corelată cu diversele funcții imunologice și toxice ale lipopolizaharidului (LPS). Ca și în cazul altor endotoxine, LPS vibrionului holeric are potențial mitogen (imunomodulator), cu activitate stimulatoare pentru macrofage, activatoare policlonală a celulelor B și endotoxică prin lipidul A. Recent s-a recunoscut și capacitatea imunogenă a lipidului A (inductor al sintezei anticorpilor aparținând claselor IgM și IgG), toate regiunile LPS fiind antigenice. După infecție, organismul este protejat prin sIgA din secreția mucoasei intestinale.

Factorii de virulență

Toxina holerică

Cu mai bine de un secol în urmă, Robert Koch (1883–1885) prezenta dovezi clare care incriminau ca agent etiologic al holerei, vibrionul (*Comma bacillus),* sugerând prezența unei toxine care se absoarbe parțial și acționează în special asupra aparatului cardiovascular.

Toxina holerică *(„Choleragen"* sau *holotoxina holerică)* este o enterotoxină reprezentată de o moleculă proteică mare (gr. mol. 82 kDa), alcătuită din trei subunități notate A1, A2 și B. *Subunitatea A,* complexă, este sintetizată ca o catenă polipeptidică unică, clivată în celulele producătoare, sub acțiunea proteazelor în alte două subunități: A1 și A2. *Subunitatea A1* reprezintă componenta biologic activă, purtătoare a funcției toxice, care este slab imunogenă. Are funcția ADP-ribozilantă a unui component al sistemului adenilat ciclazei. Separată de restul moleculei, are un efect nesemnificativ asupra celulelor întregi. *Subunitatea A2* (gr. mol. 5 kDa) este legată de A1 printr-o legătură disulfidică (-S-S-). Poate fi separată cu solvenți de disociere (detergenți, guanidină hidroclorică 6M). Inițial, s-a considerat ca având rolul unic de stabilizare a complexului A. Apoi s-a demonstrat ca A2 este necesară și pentru translocația toxinei în celulă, deoarece poartă o secvență „semnal", implicată în transferul transmembranar.

Subunitatea B („Choleragenoid" sau *„Toxoid H",* gr. mol. 56 kDa), este lipsită de activitate toxică, dar, în schimb, are activitate antigenică (toxoid). Este alcătuită din *cinci subunități identice.* Modul de grupare a subunităților este puțin cunoscut. Are funcția de legare a toxinei de membrana celulară.

Sinteza toxinei holerice este controlată și reglată de genele *tox* cromosomale (sau *ctx*), Subunitățile A și B ar fi sintetizate separat în citoplasmă pe polisomi liberi. Asamblarea lor într-o moleculă unică se face în spațiul periplasmic, de unde sunt eliberate foarte eficient în mediul înconjurător.

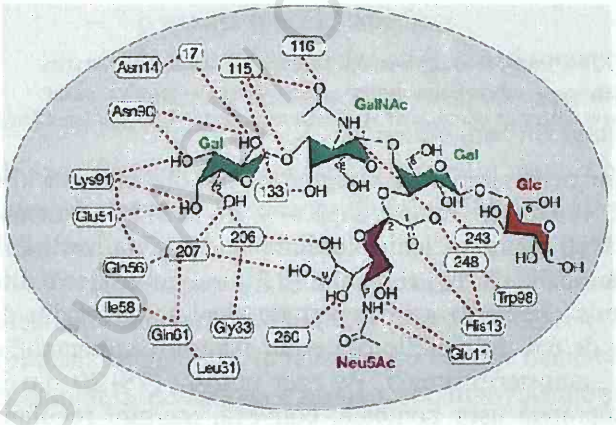


Fig. 267. Structura simplificată a gangliozidului GM1 și prezentarea situsurilor de legare a toxinei holerice prin diferiți aminoacizi ai subunității B (după Cummings și Esko, 2009).

b) *Pătrunderea enterotoxinei în enterocit.* Toxina se fixează la receptorii specifici din platoul striat al enterocitului, reprezentați de monosialogangliozidul – GM1.

Gangliozidele sunt molecule lipidice complexe prezente în toate membranele plasmatice studiate. Ele au o porțiune hidrofilă, încărcată electronegativ, care conține resturi de D-galactoză, D-glucoză, N-acetil galactozamină și acid N-acetil neuraminic, precum și o porțiune lungă hidrofobă – *ceramida* – care conține acizi grași cu lanț lung asociați cu *sfingozina.* Unul dintre cele mai cunoscute gangliozide este GM1 (galactozil-N-acetil-galactozaminil-sialozil-lactozil-ceramida), prezent în cantitate mare și în țesutul cerebral (fig. 267). Datorită

acestei particularități structurale, ceramida se poate insera în faza fluidă a membranei celulare, lăsând porțiunea glucidică a moleculei pe fața externă a membranei, pentru a acționa ca receptor pentru toxina holerică.

Capacitatea gangliozidelor, în general, și a GM1 în special, de a lega toxina holerică și corelația strânsă dintre cantitatea de gangliozide și cea de toxină legată, demonstrate experimental, sunt dovada faptului că gangliozidele sunt receptorii naturali pentru toxina holerică.

În plus, toxina legată de gangliozide este inactivă și nu se mai poate lega de alte celule. Numărul receptorilor gangliozidici de toxină holerică este variabil, în funcție de natura celulelor. Numărul moleculelor de toxină holerică necesare pentru producerea unor modificări morfologice este de 10/celulă, iar pentru efectul toxic de 50/celulă. Discrepanța dintre numărul relativ mare de receptori și concentrația de toxină necesară pentru a produce efecte biologice evidente reflectă fie ineficiența procesului de înglobare a toxinei, fie existența a două tipuri de receptori (eficienți și ineficienți).

S-au descris două mecanisme de pătrundere a toxinei în celule:

1) *Mecanismul principal* de înglobare este reprezentat de endocitoza mediată de receptori. După Sahyoun și Cuatrecasas (1975), inițial o singură subunitate B s-ar lega de gangliozide. Ulterior ar avea loc o difuzie laterală în planul membranei celulare, până când toate cele cinci subunități ale toxinei s-ar asocia cu cinci molecule de gangliozide. Deplasarea laterală a complexelor toxină/GM1 este demonstrată de cel puțin două fenomene: 1) stoparea deplasării complexului în prezența anticorpilor specifici și blocarea efectului toxic; 2) în intestin, toxina holerică se leagă de bordura în perie a celulelor mucoasei. Ori, adenilat ciclaza este localizată exclusiv pe suprafețele laterale și bazală a celulelor. Deci, pentru a-și exercita efectul, toxina, după ce s-a legat în regiunea apicală a celulelor intestinale, trebuie să se deplaseze pe suprafața celulei, spre zona latero-bazală. În cursul deplasării complexului toxină/receptor, în planul membranei s-ar realiza o redistribuire a receptorilor, cu formarea de „petice" („*patch*") și „bonete" („*capping*"). Bonetarea ar favoriza asocierea complexului toxină/receptor cu o proteină membranară integrată, care ar favoriza translocația complexului în celulă.

2) *Al doilea mecanism* posibil de încorporare a toxinei holerice se bazează pe unele dovezi experimentale, care demonstrează apariția unor alterări conformaționale ale toxinei, după legarea la receptori. Legarea subunității B ar induce modificări de permeabilitate a membranei și în plus „inelul" B s-ar deplia, favorizând formarea unui „canal" în structura acesteia.

Subunitatea A, eliberată de constrângerile impuse de restul subunităților proteice cu care a fost asociată, poate interacționa și traversa membrana lipidică.

Eliberarea segmentului activ A1 în celulă se face prin clivarea legăturilor S-S. Agentul reducător natural este glutationul, ceea ce explică faptul că legăturile S-S se mențin rareori în mediul intracelular.

c) *Mecanismul de acțiune*. Toxina holerică acționează producând ADP-ribozilarea subunității reglatoare a sistemului adenilat ciclazei.

Adenilat ciclaza este o enzimă multisubunitară, localizată pe fața internă a membranelor celulare, având componentul catalitic în contact cu citosolul. Ea poate exista sub formă activă sau inactivă, datorită unui component reglator cunoscut sub denumiri diferite: proteina G, proteina G/F sau proteina Ns a ciclazei, și care are un situs de legare pentru GTP. În stare activă, adenilat ciclaza are un rol esențial în modularea concentrației AMPc, cu efecte directe asupra metabolismului celular, după reacția: ATP ↔ AMPc + PPi.

În absența activatorului ciclazei, concentrația AMPc revine rapid la normal, datorită enzimei AMPc-fosfodiesteraza, prezentă permanent în celule. Ea are rolul de a hidroliza AMPc la AMP (fig. 268). În felul acesta, concentrația AMPc în celule este, în orice moment, rezultatul a două efecte opuse: al adenilat ciclazei și al fosfodiesterazei.

Totodată, Kieffer și colab. (1975) au demonstrat că toxina holerică ar inhiba guanilat ciclaza și ar scădea concentrația GMPc în celulă. S-ar realiza astfel,

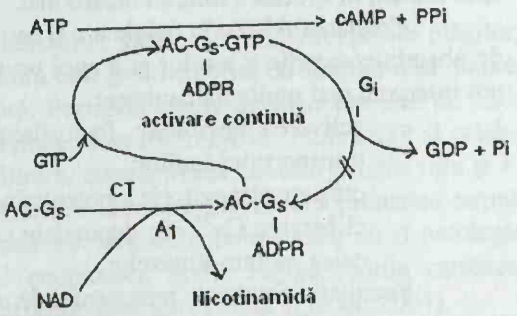


Fig. 268. Reprezentarea schematică a reacțiilor implicate în calea adenilat ciclazei.

un dezechilibru al celor doi produşi cu importanţă fundamentală pentru celulă, AMPc şi GMPc, a căror concentraţie, după cum se ştie, oscilează în sens opus: când unul creşte, celălalt scade.

Sintetizând aspectele moleculare ale acestui proces, reiese următoarea schemă de evoluţie: complexul proteină G/GTP interacţionează cu componentul catalitic al ciclazei, pentru a forma un sistem activ în sinteza AMPc din ATP. Hidroliza GTP la GDP converteşte proteina de reglare G la o formă care nu mai activează unitatea catalitică. Pentru a reactiva sistemul enzimatic, are loc disocierea complexului proteină G/GDP, urmată de legarea, din nou, a GTP de situsul originar.

Funcţional, ADP-ribozilarea proteinei de reglare G de către toxina holerică (subunitatea A1), converteşte această proteină la o stare incapabilă să producă hidroliza GTP. Ori, inhibarea activităţii GTP-azei determină o activare persistentă a componentei catalitice a ciclazei. Rezultatul final este creşterea concentraţiei AMPc în celulă (fig. 269).

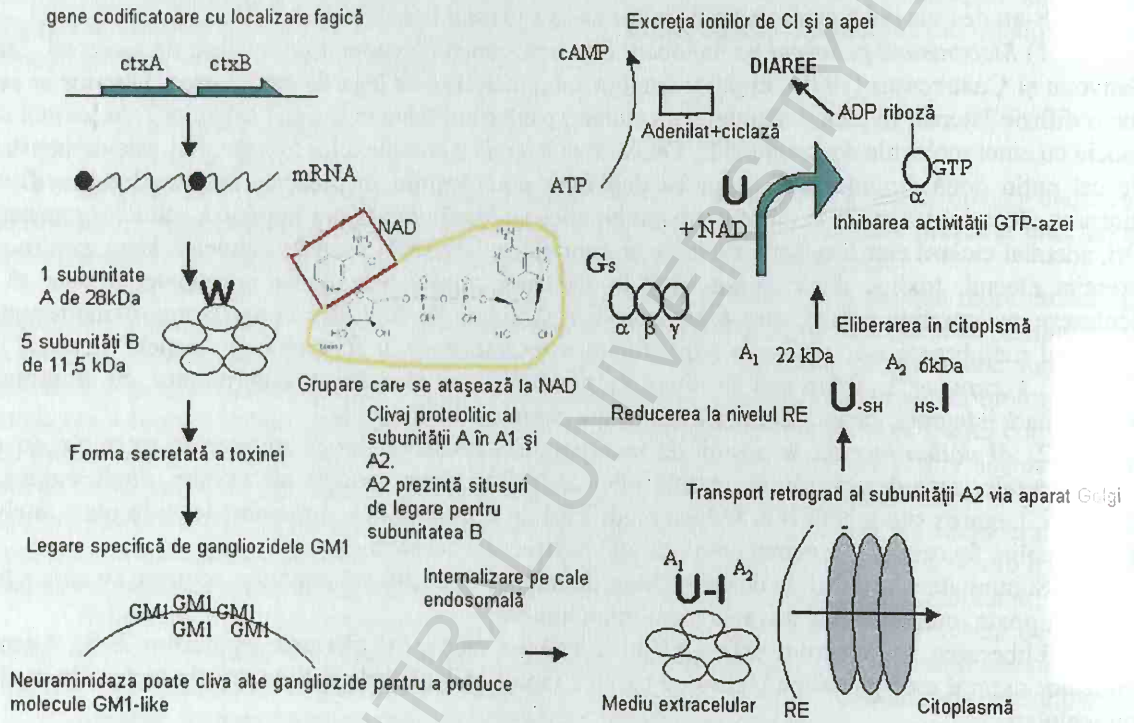


Fig. 269. Ilustrarea schematică a mecanismului de acţiune a toxinei holerice (după Primm, 2002).

d) *Consecinţele creşterii AMPc în celule*. În mod obişnuit, celulele mucoasei intestinale au un potenţial electric transmembranar cu o valoare mică, ceea ce explică schimburile echilibrate, datorate permeabilităţii pasive accentuate a mucoasei, ce asigură fluxul unidirecţional de Na^+ şi Cl^- din lumen spre circulaţia sanguină. Acesta este compensat de un flux moderat în direcţie opusă, cu deplasarea spre lumen, în special a ionului bicarbonat.

Creşterea AMPc în celule are o serie de efecte profunde, deoarece perturbă procesele normale de absorbţie/secreţie a ionilor şi a apei prin epiteliul intestinal. Pentru realizarea acestui dezechilibru pot interveni mai multe mecanisme:

- activarea enzimelor fosforilante de tipul protein-kinazelor, cu acţiune directă asupra transportului ionilor;
- creşterea tranzitorie a potenţialului electric membranar;
- eliberarea Ca^{2+} din depozitele celulare şi acţiunea acestora asupra purtătorilor de ioni, pe calea protein-kinazelor.

Rezultatul final este reprezentat de *diminuarea absorbţiei* Na^+ în celulele microvililor asociată cu creşterea simultană a *eliminării* Cl^-, reducerea absorbţiei Na^+ şi Cl^- şi un eflux masiv de apă. Astfel se explică particularitatea clinică majoră a *enteritei acute*, cu pierdere masivă de lichide, deshidratare gravă şi şoc consecutiv.

Un factor favorizant îl constituie mobilitatea agentului patogen, care îi permite să pătrundă prin mucusul intestinal în criptele microvilozităților, să se lege de bordura în perie a enterocitelor. Probabil că un rol important în aderența la mucoasa intestinului subțire îl au fimbriile și flagelii, structuri ce ancorează celulele bacteriene la epiteliul mucoasei. Astfel, celulele bacteriene rezistă la eliminare prin fluxul conținutului intestinal și peristaltism.

Toxinele accesorii. Unele tulpini de *V. cholerae* O:1, cu mutații specifice în regiunea *ctx*, sunt capabile să producă boala diareică, prin secreția unei toxine care mărește permeabilitatea mucoasei intestinului subțire, acționând asupra structurii joncțiunilor intercelulare, *toxina zonula occludens* (ZOT), denumită astfel după situsul de acțiune.

O altă toxină, *toxina holerică accesorie* (ACE), a fost identificată de Trucksis și colab. (1993). Genele *zot* și *ace* sunt localizate în *„caseta de virulență"* (regiune genomică mobilă, datorită secvențelor repetate invers localizate la ambele capete, sau la o singură extremitate), alături de genele *ctx*.

Circa 60% din totalul infecțiilor cu *V. cholerae* biotip clasic sunt asimptomatice. Dacă infecția se face cu alimente contaminate, sunt necesare 10^2–10^4 celule. Pentru persoanele cu aciditate gastrică optimă, sunt necesare 10^{10} celule ingerate, pentru că *V. cholerae* este sensibilă la pH acid.

Pentru cazurile cu evoluție clinică, incubația este de 1–4 zile, în funcție de numărul celulelor bacteriene ingerate. Starea de rău general se instalează brusc, cu vomă, dureri abdominale și diaree profundă. Scaunele au aspectul tipic de "apă cu orez" și conțin celule epiteliale, număr mare de vibrioni. Fluidul și electroliții se pierd rapid, rezultatul fiind deshidratarea profundă, colapsul circulator, anuria. În absența tratamentului, mortalitatea poate atinge 50%.

Rezervorul natural al *V. cholerae* este apa. Bacteria trăiește atașată de alge, de crustacee, unde poate supraviețui în stare de latență, pe perioade de ordinul anilor, reluîndu-și creșterea în condiții adecvate.

Pentru *diagnostic*, probele de apă sau de scaun diareic se însămânțează direct sau după îmbogățire în apă peptonată alcalină (pH 9.6) (timp de 6–24 ore) pe medii selective (BSA – *Bile Salts Agar*) sau înalt selective (TCBS) (*Thiosulphate – Citrate – Bile Salts – Sucrose*). *V. cholerae* formează colonii cu aspect caracteristic (colonii în picătură de rouă pe BSA, respectiv, colonii galbene, lactozo-pozitive pe TCBS). Din coloniile dezvoltate pe BSA se realizează aglutinarea cu ser anti O:1 și anti O:139, reacția oxidazei și identificarea biochimică.

V. mimicus este considerat în scara filogenetică ca o verigă între *V. cholerae* și vibrionii halofili, este varianta zaharoză-negativă a speciei *V. cholerae*. Cei doi vibrioni au fenotipuri și genotipuri similare. Unele tulpini sintetizează CT (fără a produce însă infecții epidemice), alte tulpini produc toxina TDH și toxina termostabilă. *V. mimicus* produce diaree și infecții auriculare.

Vibrio parahaemolyticus este un microorganism halofil, estuarin, descoperit în 1950 în Japonia unde a provocat prima epidemie. Deși nu toate tulpinile sunt patogene, *V. parahaemolyticus* este cauza majoră de gastroenterită în țările unde se consumă fructe de mare crude (creveți, crabi, homari) (Yeung și Boor, 2004). Prevalența infecțiilor cu această bacterie este în relație directă cu creșterea temperaturii apei. Temperatura, salinitatea, zooplanctonul, fluxul/refluxul și cantitatea de oxigen dizolvat în apă joacă un rol important în distribuția spațială și temporală a acestei specii (Nair *et al.*, 2007). Tulpinile patogene se grupează în cel puțin 13 serogrupuri determinate de antigenele O și K. *V. parahaemolyticus* O3:K6 are caracter pandemic.

Vibio parahaemolyticus produce trei tipuri de sindroame: gastroenterită, infecții ale plăgilor, septicemie. (Burdette și colab., 2009). Cel mai comun sindrom este gastroenterita cu simptomele: diaree, crampe abdominale, amețeală, vomă, dureri de cap și febră. Perioada medie de incubare este de 15 h (între 4–96 h). Boala este autolimitantă și moderată ca severitate, durează în medie 3 zile (Nair și colab., 2007). Fructele de mare, care în general se hrănesc prin filtrare, concentrează bacterii printre care și *V. parahaemolyticus*, care poate produce infecții prin consumul de alimente insuficient preparate termic (Yeung și Boor, 2004). Infecția poate fi fatală pentru pacienți imunocompomiși sau cu o patologie preexistentă precum bolile hepatice, diabetul, pacienții neoplazici, bolile renale, bolile cardiace, intervențiile gastrice recente, utilizatorii de medicamente antiacide gastrice (Yeung și Boor, 2004).

Există două biotipuri distincte de *Vibrio parahaemolyticus*, evidențiate prin cultivarea microorganismului pe agar Wagatsuma. Acest tip de agar conține hematii umane sau provenite de la

iepure. Un biotip produce liza hematiilor fiind pozitiv pentru fenomenul Kanagawa (KPP), iar celălalt este negativ pentru fenomenul Kanagawa (KPN) (Bates şi Oliver, 2004). Fenomenul Kanagawa a fost observat la 80–90% din tulpinile clinice şi doar la 1–2% din tulpinile izolate din natură. Cauza hemolizei evidenţiate pe agarul Wagatsuma este producerea hemolizinei termostabile directe (*thermostable direct hemolysin*-TDH). Activitatea TDH constă în liza eritocitelor de la mai multe specii, citotoxicitate, toxicitate letală pentru animale mici de laborator, stimularea acumulării de lichid în ansa ileală de iepure.

Tulpinile izolate de la pacienţi cu gastroenterită prezintă fie TDH, fie o hemolizină înrudită, TRH (*thermostable direct hemolysin related hemolysin*) sau în unele cazuri ambele proteine.
Funcţia hemolitică are la bază proprietatea de toxină formatoare de pori a TDH ce induce o liză coloidală osmotică a hematiilor provenite de la diverse specii de mamifere (Fabri *et al.*, 1999).

Printre factorii de virulenţă ai *V. parahaemolyticus* se numără şi două sisteme de secreţie de tip 3 (T3SS). Recent, s-a demonstrat că T3SS1 induce moartea celulară rapidă a celulelor eucariote ce se iniţiază cu autofagia. Autofagia este procesul prin care celulele degradează proteinele vechi şi îşi înlocuiesc organitele afectate prin proteoliză lizosomală.

Vibrio alginolyticus este o specie halofilă care rezistă la concentraţii de NaCl de 1–12 g%. Trăieşte în apele marine, costale, estuarine şi pe fauna acestora (scoici, peşti, crabi, creveţi). Este mult mai puţin sensibil la variaţiile de temperatură din mediul extern, fiind prezent în mediul marin pe tot parcursul anului. A fost izolat ocazional şi din intestinul omului sănătos. Determină enterite acute fără diaree şi infecţii extraenterice: infecţii ale ţesuturilor moi, otite, infecţii oculare, ale plăgilor arse, infectate prin contactul cu apa marină, pneumonii de aspiraţie (la înnecaţi resuscitaţi). Pentru acest vibrion, este caracteristic fenomenul de invazie (ca şi la *Proteus*) după însămânţare pe mediu neselectiv.

Vibrio vulnificus rezistă la concentraţii de NaCl de 1–6 %. Se găseşte pe flora marină normală şi în regiunile costale (estuarine). Majoritatea cazurilor de infecţie apar în lunile calde (mai-octombrie) pe coastele marine unde se consumă fructe de mare crude. 50–60% din infecţiile umane sunt fatale. Acest vibrion are mare capacitate de invazie producând infecţia cea mai severă dintre toate speciile de vibrioni, cu tablou septicemic, consecutiv ingerării de fructe de mare (stridii contaminate). În absenţa oricăror simptome enterale, după o săptămână de la ingerarea alimentelor contaminate sau de la contaminarea plăgilor (infectarea ulcerelor trofice ale gambelor). apar semnele de infecţie septicemică (febră, stare de prostraţie etc.). În cazul leziunilor pielii suprainfectate, apar manifestări dermo-epidermice buloase cu necroza dermului de la nivelul căruia vibrionii diseminează pe cale hematogenă producând septicemie fulminantă cu evoluţie fatală. În aceste cazuri lipseşte total răspunsul de tip inflamator, dar apar leziuni de tipul vasculitei necrozante a ţesutului subcutanat. Starea de *sepsis* fulminantă pare că se datorează unei toxine RTX formatoare de pori, cu acţiune hemolitică ce determină necroza celulară. *V. vulnificus* poate produce infecţii auriculare, pneumonii de aspiraţie (la înnecaţi resuscitaţi), meningite, infecţii conjunctivale, corneene. Au fost raportate şi cazuri de miozita bacteriană în care nu s-a putut pune în evidenţă poarta de intrare cutanată. Studiile din ultimii ani au descris la tulpinile de *V. vulnificus* două genotipuri: C, prezent la 90% din tulpinile de origine clinică, şi E, prezent la 93% din tulpini izolate din mediul extern. S-a demonstrat că cele două genotipuri prezintă proprietăţi identice (rată de creştere, capacitate de supravieţuire la diferite concentraţii de NaCl şi la diferite temperaturi, sensibilitate la hemolimfa scoicilor, mobilitate, răspuns la stresul oxidativ), singura diferenţă fiind rezistenţa mai mare la acţiunea bactericidă a serului uman pentru tulpinile de genotip uman C datorită prezenţei unui siderofor.

V. damsela a fost izolat din apele Oceanului Pacific, fiind implicat în infecţiile plăgilor expuse la apa marină.

V. charcariae este specia descrisă recent de vibrioni halofili, care la om produce infecţii extraenterale (a fost izolat din plăgi suprainfectate consecutiv muşcăturii de rechin).

V. cincinnatiensis a fost izolat ocazional din sânge şi lichid cefalorahidian la pacienţi cu infecţii generalizate.

V. hollisae a fost izolat ocazional din cazuri de diaree.

Grupul F (sau grupul CDC EF6) ocupă o poziţie intermediară între genul *Vibrio* şi *Aeromonas*, necesitând pentru dezvoltare o concentraţie de NaCl de 1–7% şi chiar 10%. Cuprinde

speciile *V. fluvialis şi V. furnisii.* Habitatul natural este reprezentat de zonele estuarine, sedimente marine şi ape menajere.

V. fluvialis este un patogen emergent care produce boală diareică acută, atât cazuri sporadice, cât şi focare de diaree tip holeriform (cu dureri abdominale, vomă, scaune apoase, deshidratare masivă) sau diaree muco-sanguinolentă.

V. furnisii are ca habitat natural zonele estuarine, apele râurilor şi peştii. Poate declanşa epidemii de boală diareică la om şi animale (la porcii hrăniţi cu concentrate din praf de peşte).

V. anguillarum colonizează ţesutul cutanat al broaştelor ţestoase şi a peştilor, iar în 5–24 ore formează deja biofilme, de la nivelul cărora traversează bariera cutaneomucoasă producând septicemie hemoragică fatală la peştii marini.

V. metschnikovii este singurul vibrion oxidazo-negativ şi a fost izolat din ape de suprafaţă (râuri, estuare), ape de canal fecaloid menajere, fructe de mare, unele specii de crustacee, din intestinul omului şi animalelor. Nu este considerat în mod cert ca agent patogen. Este interesant că acest vibrion, în comparaţie cu toţi ceilalţi, are reactivitate total inversă la variaţiile de temperatură, fiind prezent în cochiliile crustaceelor numai în perioada rece a anului. De la om a fost izolat din cazuri de septicemie şi de colecistită.

12.1.2. Genul *Aeromonas*

După Bergey (ed. 1984) genul *Aeromonas* cuprinde două grupe separate: i) aeromonade pshichrofile imobile reunite sub denumirea de *Aeromonas salmonicida,* patogenă la peşti; ii) aeromonade mezofile mobile divizate în trei specii: *A. hydrophila, A. caviae* şi *A. sobria,* implicate în patologia umană, deşi analizele de hibridizare ADN au permis stabilirea a 12 genomospecii.

A.hydrophila reuneşte bacili Gram negativi, mobili (flagel monotrih dispus polar), drepţi sau foarte rar curbaţi, dispuşi în pereche sau lanţuri, pleomorfi (de la forme cocoidde până la forme filamentoase), facultativ anaerobi, de obicei necapsulaţi, rezidenţi ai microbiotei acvatice, cu o distribuţie practic cosmopolită în medii umede cu substanţe organice, având un optimum de creştere la 22–37°C, deşi se pot dezvolta şi la temperaturi cuprinse între 0°C şi 45°C. Prezintă toleranţă pentru NaCl, între 0 şi 4%.

A. hydrophila se dezvoltă cu uşurinţă pe medii uzuale de cultură, pe care formează colonii asemănătoare enterobacteriilor. Pe mediile de izolare folosite în diagnosticul *Enterobacteriaceaelor,* dezvoltă colonii lactozo-negative sau pozitive, asemănătoare cu *E. coli.* Pe geloză-sânge pot produce uneori β-hemoliză, caracter asociat cu virulenţa. Unele tulpini produc dublă hemoliză: o zonă externă de hemoliză incompletă şi una internă, completă, de β-hemoliză (Buiuc şi Neguţ, 2002).

Ca agent selectiv se utilizează ampicilina (5 μg/ml) (mediu Havellar) (fig. 270).

A. salmonicida cultivat pe agar nutritiv, incubat la 22°C timp de 48 ore formează colonii rotunde şi transparente, iar pe medii cu 1% tirozină formează un pigment brun hidrosolubil. Coloniile de *A. caviae* sunt nehemolitice.

Sunt oxidazo-pozitivi, catalazo-pozitivi. *A. hydrophila* este divizat în 2 biotipuri: I – produce gaz prin fermentarea glucozei; II – fermentează glucoza fără producere de gaz. Fermentează fructoza, maltoza, trehaloza şi uneori lactoza, hidrolizează amidonul, dextrina, cazeina şi glicerolul, nu fermentează adonita, inozina, xiloza şi melizitoza. Reduc nitraţii la nitriţi, lichefiază gelatina, sintetizează o dezoxiribonuclează, lipaze, lecitinaze, fosfatază şi în general arginin-dihidrolază; unele tulpini sunt VP pozitive, deci produc acetoina din glucoza.

A. hydrophila este rezistent la acţiunea agentului vibriostatic „0"/129 (2,4-diamino 6,7 diisopropilpteridină) chiar la o concentraţie de 400 μg /disc.

A. hydrophila este sensibil la acţiunea factorilor fizici şi chimici, fiind

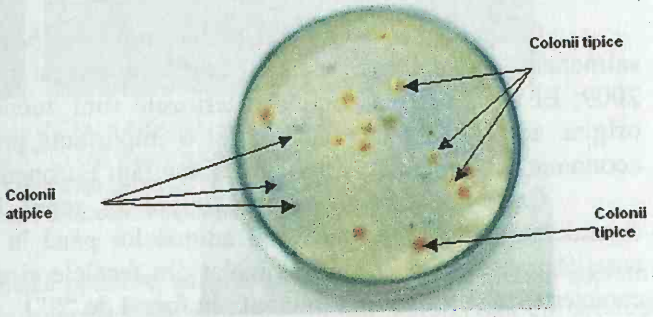


Fig. 270. Aspectul coloniilor de *Aeromonas* pe mediu selectiv Havelaar.

distrus instantaneu prin fierbere şi în câteva minute sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete, a sublimatului şi a fenolului 1%.

Prezintă sensibilitate moderată la streptomicină şi eritromicină şi sunt rezistenţi la ampicilină, carbenicilină, penicilină, oxacilină şi meticilină.

Un procent foarte mare din tulpinile de *Aeromonas* sunt producătoare de β-lactamaze sensibile sau rezistente la inhibitori.

Aeromonadele sunt implicate atât în infecţii intestinale (mai ales gastroenterite), cât şi extraintestinale (infecţii ale ţesuturilor moi – tonsilite, infecţii de plagă, meningite, bronhopneumonii, peritonite, septicemii, ulcere corneene etc) (Janda, 1988, 1991).

Virulenţa genului *Aeromonas* este multifactorială. Principalul factor de virulenţă este β-hemolizina citotoxică sau citolitică sau aerolizina produsă de *A. hydrophila, A. sobria, A. caviae* şi *A. trota.* Aerolizinele sunt toxine formatoare de pori care produc acumulare de lichid în ansa ileală de iepure probabil prin stimularea producerii de AMPc, au efect letal la şoarece şi exercită efect citotoxic asupra diferitelor celule eucariote.

Aerolizina stimulează apoptoza celulară, producerea factorului tumoral α şi a altor citokine proinflamatorii, precum şi activarea metabolismului acidului arahidonic în macrofage.

O altă β-hemolizină produsă de *Aeromonas* este hemolizina *Hly A*, care are 45–51% omologie a aminoacizilor cu toxina holerică şi cu toxina Shiga *like* 1. Au fost descrise şi alte enterotoxine citotonice, care nu sunt hemolitice şi determină alungirea celulelor CHO (*C*hinese *H*amster *O*vary), ca şi producerea de AMP ciclic (e.g. proteina termostabilă de 15–20 kDa, proteina termolabilă de 44 kDa şi proteina *Ast* de 71 kDa).

Aeromonadele secretă o varietate de enzime şi molecule (metaloproteaze, serinproteaze, DN-aze, lipaze, lecitinaze, colesterol acetil- transferaza, enolaza, siderofori) al căror rol în patologia umană nu a fost încă demonstrat. Aderenţa la celulele epiteliului intestinal este un factor de virulenţă esenţial pentru patologia infecţiilor enterice. Structurile filamentoase implicate în aderenţă includ pilii flexibili *Bfp* şi flagelii laterali şi polari. Unele tulpini de *A. hydrophila, A sobria* şi *A. caviae* invadează celulele HEp-2, celulele intestinale CaCo-2 şi linia celulară Henle 407.

12.1.3. Genul *Photobacterium*

V. fischeri se găseşte în mediul marin atât în zonele temperate, cât şi în cele subtropicale ca simplu saprobiont sau asociat în interacţiuni cooperative (organele luminoase ale unor specii de peşti sau moluşte) sau patogene pentru animalele gazdă.

V. harveyi este un patogen semnificativ al vertebratelor marine, dar apare ocazional şi în infecţii la om. La peşti produce ulceraţii, leziuni oculare, gastroenterite. La scoici determină o vibrioză luminoasă (stralucirea în întuneric). La om produce infecţii ale plăgilor după muşcătura de rechin. Patogenitatea sa se datorează adezinelor, proteazelor, hemolizinelor, LPS şi sideroforilor.

12.2. Spirili

12.2.1. Campylobacterii

Campylobacteriile (lb. greacă *kampylos* + *bakteria* = bacil curbat) sunt considerate, alături de salmonele, cei mai importanţi agenţi etiologici ai gastroenteritelor bacteriene la om (FAO/WHO, 2009; EFSA, 2010). Campylobacteriozele sunt zoonoze care au ca principală sursă alimentele de origine animală, reprezentând astfel o importantă problemă de sănătate publică, cu impact socio-economic deosebit, atât la nivelul Comunităţii Europene, cât şi pe plan mondial.

Campylobacteriile, incluse iniţial în genul *Vibrio* (numite anterior *Vibrio fetus*) au fost considerate patogeni exclusivi ai animalelor până în 1938, când Levy, în cursul unei epidemii de enterită transmisă prin lapte, a izolat din fecalele şi din sângele bolnavilor bacteriile cu morfologie caracteristică (bacili subţiri, curbaţi, în formă de "S").

În 1973 Véron şi Chatelain au inclus în genul *Campylobacter* speciile *C. fetus, C. jejuni* şi *C. coli* (Moore şi colab., 2005; Euzeby, 2010). În prezent, genul cuprinde 22 specii, cu 10 subspecii şi

3 biovariante, încadrate în 3 grupe: grupa termofililor, grupa „fetus" şi grupa anaerobilor. Toate speciile se dezvoltă la 37°C, dar *C. jejuni, C. coli, C. lari* şi *C. uppsaliensis* sunt catalogate ca specii termofile datorită dezvoltării optime a majorităţii tulpinilor la 41–43°C. *C. jejuni* şi *C. coli* sunt considerate cele mai importante specii pentru sănătatea publică, implicaţia celorlalte fiind mai redusă. *C. jejuni* subsp. *jejuni* este agentul etiologic principal al enteritelor acute, iar *C. jejuni* subsp. *doylei* nu este termofilă şi a fost izolată doar de la copii cu sindrom diareic din ţările dezvoltate. În general, când se utilizează doar denumirea de *C. jejuni,* se face referire la subsp. *jejuni.*

Bacteriile din genul *Campylobacter* se caracterizează prin polimorfism morfologic. Sunt bacili Gram negativi nesporulaţi, curbaţi, în formă de S, virgulă, pescăruş în zbor sau spiralaţi, cu diametrul 0,2–0,8 μm şi lungimea 0,5–8 μm. În cazurile în care celulele nu se separă după diviziune, se pot observa şi forme spiralate foarte lungi. Majoritatea speciilor genului sunt mobile, mono- sau amfitriche, cu mişcări rapide caracteristice, de tirbuşon. Există şi excepţii: *C. hominis* se prezintă sub formă de bacili drepţi, imobili iar *C. gracilis* este o specie imobilă.

În condiţii de stres şi în culturile învechite s-a remarcat transformarea formelor spiralate în forme cocoide, care de fapt permit campylobacteriilor supravieţuirea la variaţiile condiţiilor de mediu. Există posibilitatea ca formele cocoide să-şi piardă capacitatea de a fi subcultivate pe medii de cultură şi să se transforme în forme viabile dar necultivabile (*viable but non culturable* – VBNC), viabilitatea putând fi redobândită prin pasaje pe animale sau protozoare.

Heterogenitatea morfologică şi fiziologică a celulelor bacteriene aparţinând speciilor din genul *Campylobacter,* în relaţie cu condiţiile de mediu, poate fi surprinsă chiar în interiorul unei colonii dezvoltate pe suprafaţa unui mediu solid. La periferia coloniei celulele bacteriene sunt active metabolic, în timp ce în centrul şi la suprafaţa coloniei, unde nutrienţii s-au epuizat, bacteriile sunt îmbătrânite şi inactive. Astfel, la examinarea prin metoda SEM s-au observat diferite aspecte morfologice ale bacteriilor, în funcţie de localizarea lor în colonie, cu predominanţa formelor spiralate la periferie şi a formelor cocoide în centrul clonei, ceea ce sugerează că bacteriile spiralate sunt formele active, iar cele cocoide sunt formele inactive. Trecerea de la formele spiralate la cele cocoide se realizează printr-o formă intermediară, cu aspect de „gogoaşă", al cărei mecanism de formare este neclar (fig. 271).

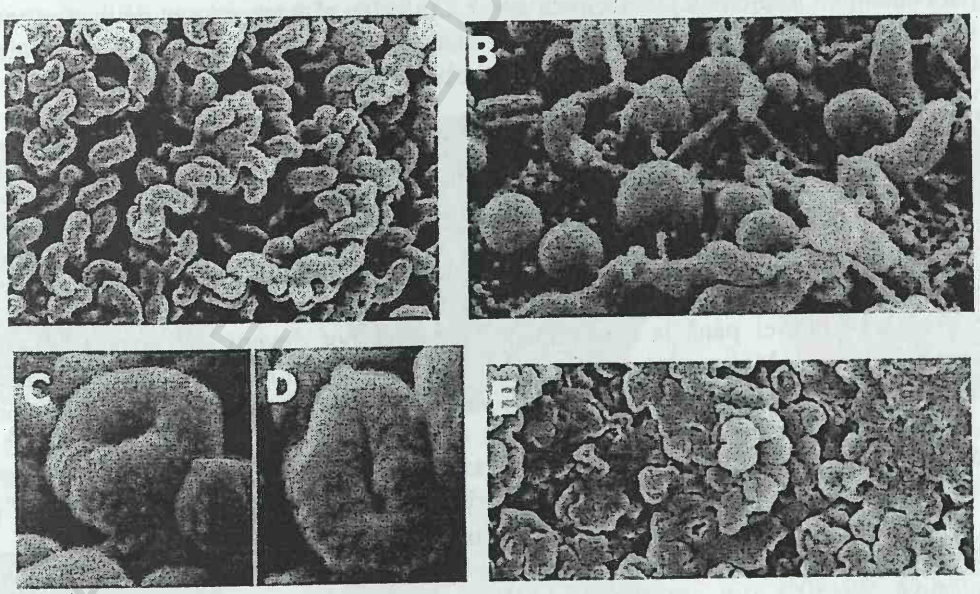


Fig. 271. Imagine electrono-optică de scanning (SEM) a diferitelor stadii celulare din diferite zone ale unei colonii de *C. jejuni,* 72 h incubaţie la 37°C: (A) forme spiralate de la periferia coloniei, (B) forme predominant cocoide şi spiralate de la suprafaţa coloniei, (C) şi (D) detaliu al aspectului de „gogoaşă", (E) forme cocoide şi material amorf din centrul coloniei (Ng, Sherburne et al. 1985).

Campylobacteriile sunt oxidază şi catalază pozitive, produc H_2S, hidrolizează indoxil acetatul şi hipuratul de sodiu, nu fermentează glucidele, energia fiind obţinută din aminoacizi sau din produşi intermediari ai ciclului Krebs. Nu hidrolizează gelatina, ureea, sunt lipsite de lipază, triptofanază.

În funcție de specie, dezvoltarea campylobacteriilor necesită temperaturi de 25–43°C, pH 7.2–7.4, concentrații de 3–15% O_2, 8–10% CO_2, aminoacizi (obligatoriu acid glutamic, acid aspartic și cistină), vitamine (niacină).

Principalii factori de virulență ai campylobacteriilor sunt mobilitatea, aderența la celulele epiteliului mucoasei intestinale, capacitatea invazivă și sinteza toxinelor.

Mobilitatea permite celulei bacteriene să se deplaseze împotriva mișcărilor peristaltice, să penetreze stratul de mucus și să colonizeze enterocitele. Mucina, o glicoproteină cu masă moleculară mare, ce conține L-fructoză, acționează ca un chemoatractant pentru *Campylobacter*.

Adezinele la *Campylobacter* sunt proteine extramembranare (CadF, JlpA, CapA) și periplasmice (Peb1, Cj1496c). S-au descris structuri de tip 'piedestal', asemănătoare cu cele induse de infecția cu EPEC. Microvilii celulelor epiteliale se dezorganizează, iar bacteriile se agregă la joncțiunile intercelulare. Ulterior aderenței, *C. jejuni* secretă un set de proteine (*Campylobacter invasion antigens* – Cia), translocate în citoplasma celulei gazdă, al căror rol în patogenitate nu a fost elucidat. Campylobacteriile pot utiliza sideroforii produși de alte bacterii din lumenul intestinal pentru a prelua Fe din compuși ai hemului.

Mai multe specii ale genului *Campylobacter* (*C. jejuni, C. coli, C. lari, C. fetus* și *C. uppsaliensis*), produc toxina de tip CDT (*cytolethal distending toxin*), care acționează prin blocarea ciclului celular în faza G_2, prin inhibiția CDC2 kinazei determinând astfel distensia celulară.

Lipopolizaharidele din structura membranei externe, caracterizate printr-o mare variabilitate structurală, sunt implicate în apariția complicațiilor autoimune, iar polizaharidele capsulare servesc la serotipizare.

C. jejuni (raportat în 90–95% din infecțiile cu *Campylobacter*) și *C. coli* (5–10%) au fost identificați ca fiind cei mai importanți agenți etiologici bacterieni ai gastroenteritelor umane.

C. jejuni și *C. coli* nu se multiplică în afara mediului intestinal al gazdelor, dar supraviețuiesc în anumite condiții de umiditate și căldură, fără expunere la razele solare. Contaminarea se poate realiza direct (contactul uman cu pielea contaminată de fecale a animalelor, prin preluarea pe mâinile omului) sau indirect (consum de apă potabilă și vegetale crude și alte tipuri de alimente contaminate încrucișat, contactul cu apele de îmbăiere contaminate). Un rol în transmiterea infecției îl au vectorii (muștele pot contamina alimentele). Principala sursă a infecției rămâne carnea de pasăre contaminată în fluxul de producție în abator. Alte categorii de alimente identificate ca posibile surse ale infecției sunt carnea de porc insuficient preparată termic, apa potabilă tratată necorespunzător, lapte crud sau pasteurizat insuficient.

Campylobacteriozele pot avea o perioadă de incubație de 1–10 zile, media fiind de 2–5 zile. Simptomele sunt nespecifice, asemănătoare cu cele declanșate de alți patogeni enterici (*Salmonella* sp., *Shigella sp., E. coli*): febră (până la 40°C), cefalee, mialgie, dureri abdominale de tip acut, stare de rău general, vomă și diaree (de la diaree apoasă până la diaree profuză și hemoragică). Pot apărea și simptome de pseudoapendicită datorate enteritei cu adenită mezenterică. Infecția enterică netratată durează în medie aproximativ o săptămână, cu vindecare spontană. S-au semnalat și cazuri cu persistența simptomatologiei până la 3 săptămâni. Pacienții pot deveni excretori asimptomatici ai bacteriei timp de 1–2 luni. Mai rar pot apărea complicații care includ hepatite, colecistite, pancreatite, cistite, sindromul colonului iritabil, avort septic, sindrom uremic hemoragic, meningite, osteomielite și septicemii (la pacienții imunocompromiși).

Complicațile postinfecțioase sunt reprezentate de afecțiuni autoimune, precum sindromul Guillain-Barré (GBS – inflamația și demielinizarea nervilor, a cărei consecință este paralizia musculară flască ascendentă, progresivă, acută, tulburări de percepție senzorială) cu varianta sa, sindromul Miller Fisher (MFS – oftalmoplegie, lipsa reflexelor și incoordonare), eritem nodos și artrite reactive. 30–50% din cazurile de GBS au fost corelate cu existența anterioară a unei infecții cu *C. jejuni*.

Tratamentul infecțiilor necomplicate nu este indicat, vindecarea fiind spontană. Totodată sunt raportate creșteri ale rezistenței tulpinilor *Campylobacter* spp. la substanțele antimicrobiene utilizate în tratament, mai ales la macrolide și fluoroquinolone.

C. pylori este pozitiv pentru testul ureazei, acest caracter reprezentând un posibil mecanism al patogenezei (protecția față de pH acid) și un criteriu fundamental pentru detectarea rapidă. Este microaerofil, crește la 37°C, dar nu la 25–30°C. *C. pylori* este asociat cu gastrita cronică și cu forma

cronică activă. La pacienții cu inflamație gastrică și pozitivi pentru *C. pylori*, celulele mucoasei sunt lezate, iar după tratamentul cu citrat de bismut coloidal sau cu salicilat de bismut, numărul celulelor bacteriene scade semnificativ și inflamația dispare.

Diagnosticul campylobacteriozelor se stabilește prin detectarea *Campylobacter* spp. în materiile fecale. Pentru izolare probele se însămânțează direct pe mediile selective sau inițial în medii pentru îmbogățire selective și apoi sunt subcultivate pe medii solide selective (tabelul 28).

Tabelul 28.

Caracteristicile fenotipice ale principalelor specii termofile ale genului *Campylobacter* (după Euzéby, 2010).

Caracteristici	*C. jejuni*	*C. coli*	*C. lari*	*C. upsaliensis*
Morfologie	Bacili mici curbați	Bacili mici curbați	Bacili mici curbați	Bacili mici curbați
Mobilitate	caracteristică	caracteristică	caracteristică	caracteristică
Creștere microaerobioză la 25°C	–	–	–	–
Creștere aerobă la 41,5°C	–	–	–	–
Oxidaza	+	+	+	+
Catalaza	+	+	+	– sau slab
Hidroliza hipuratului	+	–	–	–
Indoxil acetat	+	+	–	+
Hemoliză α	±	–	±	±

Mediile selective conțin diferite substanțe antimicrobiene (trimetoprim, vancomicină, amfotericină, rifampicină, cefoperazonă și cicloheximidă), care inhibă dezvoltarea altor bacterii din conținutul intestinal și a fungilor. Mediile selective pot fi împărțite în două grupe: medii cu sânge și medii cu cărbune. Anumite componente din sânge și cărbunele au rolul de a neutraliza derivații oxigenului (peroxizii și superoxidul) care se pot forma când mediile sunt expuse la lumină. Derivații reducerii parțiale a O_2 au efect toxic asupra campylobacteriilor datorită lipsei peroxidazei și SOD la aceste bacterii.

Campylobacteriile se dezvoltă optim într-o atmosferă cu 5–10% O_2, 5–10% CO_2 și 5–9% H_2. Timpul de incubare este de 4–6 ore la 37°C pentru mediile de îmbogățire și apoi 44 ± 4 ore la 41,5°C, iar pentru cele selective, 44 ± 4 ore la 41,5°C. Coloniile sunt polimorfe, gri lucioase, bombate sau gri metalizate pe mediile cu cărbune (fig. 272, 273), semitransparente sau opace, bombate sau difluente, nehemolitice sau rar slab hemolitice, pe mediile neselective cu sânge) (fig. 274, 275); la colorația Gram se observă bacili curbați sau forme cocoide (fig. 276–277).

Fig. 272. Colonii de *Campylobacter* spp. pe suprafața agarului Karmali (colonii gri opace, tip S).

Fig. 273. Colonii de *Campylobacter* spp. pe suprafața agarului CCDA (*Campy* Blood-Free Selective Medium) (colonii gri opace, tip R, metalizate).

Fig. 274. Colonii de *Campylobacter* spp. pe suprafața agarului Columbia (colonii semitransparente, tip S).

Fig. 275. Detaliu cultură de *Campylobacter* spp. pe suprafața agarului Columbia (aspect difluent).

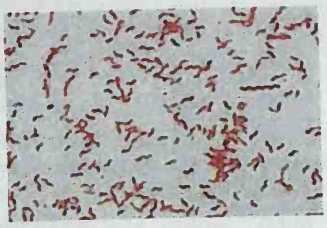


Fig. 276. Campylobacter spp. – frotiu din cultură de 44 ± 4 ore pe mediu solid. Colorație Gram. Bacili curbați, în formă de S, virgulă, „pescăruș în zbor" sau spiralați, x 1000.

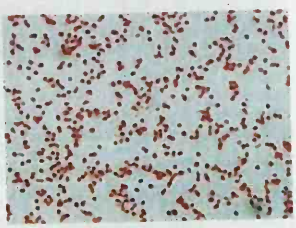


Fig. 277. Campylobacter spp. – frotiu din cultură de 70 ± 2 ore pe mediu solid. Colorație Gram, forme cocoide, x 1000.

Agentul infecțios se poate evidenția direct, prin examinarea biopsiilor de mucoasă gastrică colorate Gram. Metoda oferă rezultate certe în proporție de 85%.

12.2.2. Familia *Helicobacteriaceae*

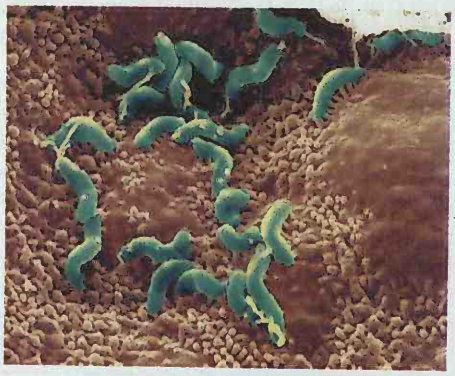


Fig. 278. H. pylori aderat la mucoasa gastrrică – imagine de microscopie electronică de *scanning* (http://www.diasource-diagnostics.com/en/Products/Rapid-Tests/Gastrointestinal-Metabolism/Helicobacter-Pylori-Hpylori/Hpylori-Card-20-tests).

Cuprinde genurile *Helicobacter* și *Wolinella*. Alături de familia *Campylobacteraceae* face parte din clasa *Epsilonproteo-bacteria*, conform ultimei ediții *Bergey's Manual*.

Helicobacter pylori este o bacterie Gram negativă, spiralată (fig. 278), mobilă, microaerofilă și capnofilă (necesită pentru creștere atmosferă de CO_2).

În 1980, Marshall a demonstrat raportul cauzal dintre aceste bacterii și ulcerul duodenal prin ingestia unei culturi bacteriene, la interval de o săptamână dezvoltând simptome de gastrită acută, cu evidențierea prezenței bacteriei în biopsiile de mucoasă gastrică. Importanța descoperirii *H. pylori* a fost recunoscută în 2005 prin acordarea premiului Nobel pentru medicină cercetătorilor australieni B. Marshall și R. Warren, care au reușit să izoleze și să cultive bacteria, corelând prezența acesteia cu diferite afecțiuni gastrointestinale.

Deși populează compartimentul gastric, nu crește la pH acid. Mucusul gastric protejează mucoasa de coroziunea acidă și are proprietăți de tampon. Pe fața luminală a stratului de mucus, valoarea pH este 1,0–2,0, iar pe fața epitelială (sub stratul de mucus), 7,4. *H. pylori* se localizează în profunzimea stratului de mucus, la valoarea pH fiziologică a suprafeței epiteliului.

Factorii de virulență ai *H. pylori* sunt, în primul rând, enzimatici (fig. 279): o *protează* care scade vâscozitatea mucusului și ușurează deplasarea flagelară a celulei bacteriene; *ureaza* hidrolizează ureea care difuzează din sânge și produce NH_4, cu efect de tampon al HCl ce tinde să difuzeze prin stratul de mucus; *mobilitatea flagelară* prin care bacteria traversează rapid stratul de mucus și ajunge la suprafața epiteliului.

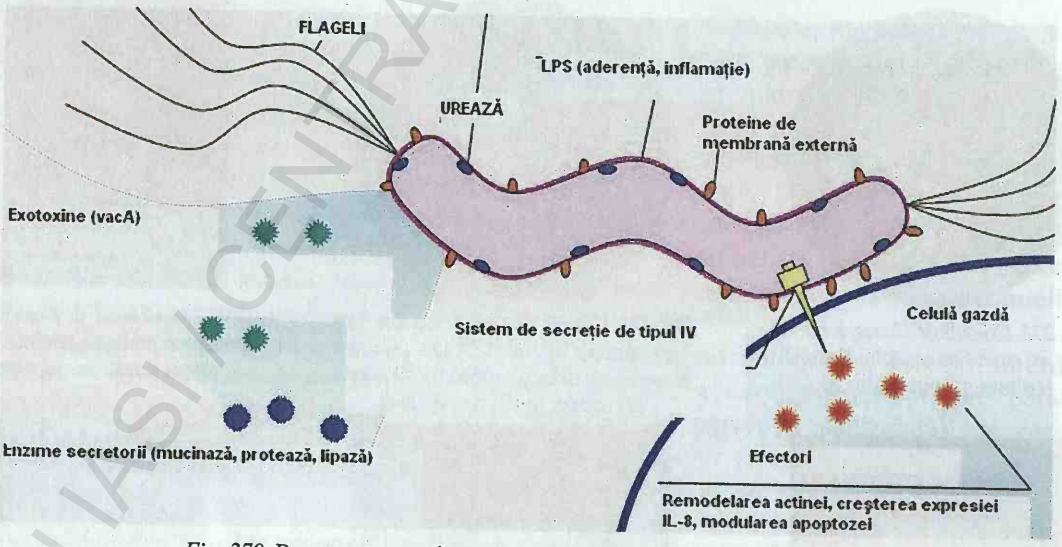


Fig. 279. Reprezentarea schematică a factorilor de virulență la *H. pylori* (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_virulence_factors_en.png).

Majoritatea tipurilor de *H. pylori* conțin VacA, o exotoxină care se inseră în membrana celulara epitelială și formează un canal selectiv hexameric, prin care pot fi eliberați bicarbonați și anioni organici. În funcție de expresia toxinei vacuolizante VacA și a citotoxinei asociate CagA (care produce reorganizări ale citoscheletului celulelor epiteliale) se disting 2 fenotipuri: I (VacA+, CagA+)

şi II (VacA-, CagA-). Tulpinile tip I induc un raspuns inflamator gastric mai intens şi se asociază mai frecvent cu ulcerul, neoplazia gastrică şi limfomul MALT.

Dintre proteinele de suprafaţă cu rol de adezine, cea mai cunoscută este BabA (78 kDa), care se leagă de Ag de grup Lewis exprimat de celulele gastrice.

Genele de virulenţă sunt localizate pe insula de patogenitate *cag*, evidenţiată la aproximativ 60% din tulpinile izolate. Din grupul de 20 de gene localizat pe această insulă face parte şi gena *picB*, al cărei produs induce secreţia citokinelor proinflamatorii.

Infecţia cu *H. pylori* este totdeauna cronică şi asociată cu leziuni de gastrită cronică şi hipoclorhidrie. Rareori produce ulcer gastric sau duodenal (fig. 280). Bacteria invadează celulele epiteliale într-o măsură limitată. Mucoasa epitelială este lezată sub acţiunea LPS, a NH_4 şi a procesului invaziv (fig. 281).

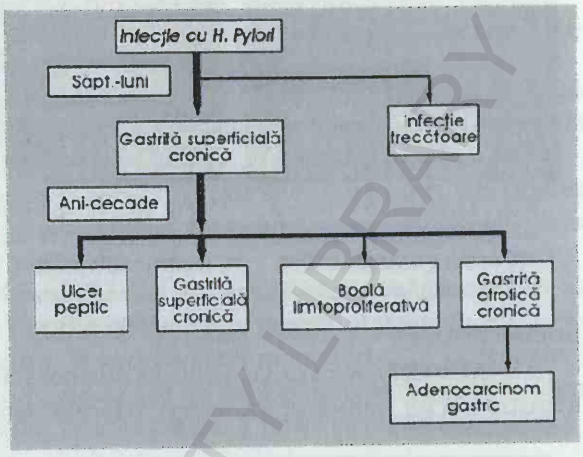


Fig. 280. Patogenia infecţiei cu *Helicobacter pylori* (Harrison, 2000).

Gastrita se caracterizează prin inflamaţia mucoasei, cu infiltrarea PMN şi a monocitelor atât în stratul epitelial, cât şi în lamina propria.

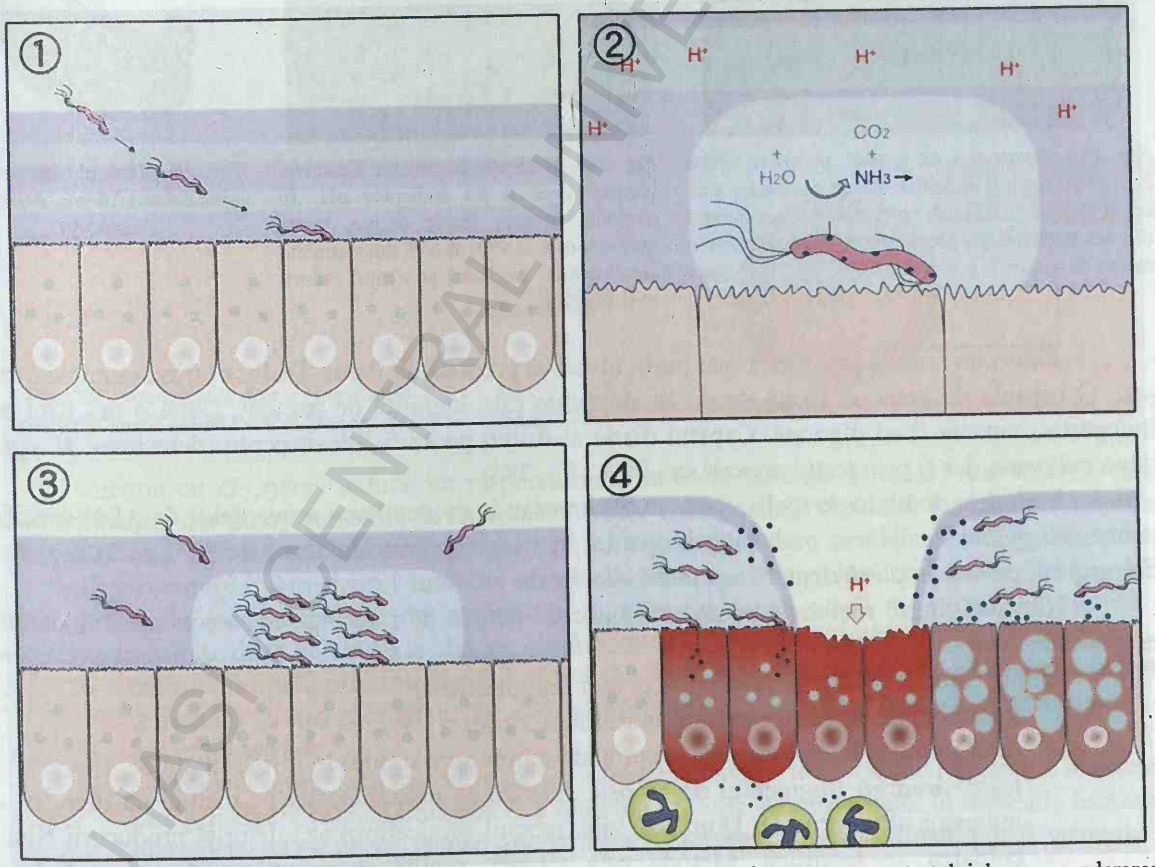


Fig. 281. Diagrama modificărilor induse de *H. pylori* la nivelul mucoasei gastrice: penetrarea stratului de mucus, aderarea la suprafaţa celulelor epiteliale, producerea de NH_3 sub acţiunea ureazei, apariţia focarului inflamator, necroza celulelor epiteliale ale mucoasei şi apariţia ulceraţiei gastrice (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_ulcer_diagram.png).

Pentru *diagnostic*, metodele invazive permit evidenţierea bacteriei *H. pylori* sau a ureazei bacteriene în probele de mucoasă gastrică obţinute prin biopsie şi examinate histologic.

BUAP CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 282. H. pylori în biopsia mucoasei gastrice. Colorație cu acridin orange, x 1000 (Megraud și Lehours, 2007).

Fig. 283. H. heilmannii în biopsia mucoasei gastrice după colorația cu hematoxilin-eozină (Megraud și Lehours, 2007).

Histologia permite diagnosticul direct pentru *H. heilmannii* care nu poate fi cultivat și poate fi ușor identificat datorită morfologiei tipice (fig. 282, 283): este mai lung decât *H. pylori,* cu 6–8 spirale, nu aderă la celulele epiteliale, este de obicei localizat în agregate la nivelul lumenului criptelor și poate induce gastrită (tranzitorie sau care poate evolua la ulcer gastric și limfom MALT).

Metodele neinvazive de diagnostic constau în detectarea anticorpilor specifici, a antigenului și a ureazei, în ser, salivă, urină, materiile fecale, aerul expirat (fig. 284, 285).

Fig. 284. Depistarea Ac anti-*H. pylori* în probe de ser. Antigenul specific marcat enzimatic este impregnat pe membrană, reacționează cu anticorpii din ser formând un precipitat evidențiat printr-o reacție de culoare în prezența unui substrat cromogen.

Fig. 285. Evidențierea ureazei Reactivul conține uree și un indicator pH. În prezența ureazei foarte active, ureea este scindată la CO_2 și NH_3 determinând alcalinizarea mediului și virajul culorii indicatorului.

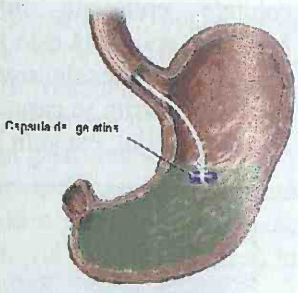


Fig. 286. Traseul capsulei de Enterotest (Adams, Atlas of Anatomy).

Enterotest este o procedură mai puțin invazivă propusă de Perez-Trallero, fiind numit și *String test.* O capsulă de gelatină fixată de un fir de nylon este înghițită de pacient. După o oră firul este îndepărtat, capsula fiind digerată. Capătul distal al firului poate fi folosit pentru detectarea *H. pylori* după cultivare, dar și prin testul ureazei sau PCR (fig. 286).

Metodele de biologie moleculară (PCR) constau în evidențierea secvențelor de ADN specifice pentru *H. pylori* în diverse prelevate: biopsiile de mucoasă gastrică recoltate prin endoscopie sau chirurgical, pe salivă, placă dentară sau materiale fecale.

Nici una dintre metodele enumerate nu este metodă de referință, deoarece sensibilitatea lor este asemănătoare.

Identificarea *H. pylori* se face pe baza mai multor criterii:

- intervalul de creștere a culturii, minimum 3 zile;
- morfologia celulelor, cu aspect spiralat (spirele sunt rigide) în forma literei S;
- *testul ureazei*: fragmentul de biopsie gastrică se însămânțează pe mediul cu uree, cu un indicator al valorii pH. După 1-2 zile, mediul se alcalinizează datorită producerii NH_4 și culoarea se modifică. Metoda este simplă, rapidă și se utilizează pe scară largă. Rezultatele fals pozitive apar la pacienții cu aclorhidrie, a căror mucoasă gastrică este colonizată cu bacterii ureazo-pozitive ce colonizează cavitatea orală și sau/stomacul.

Activitatea ureazei se poate evidenția *in vivo*: ureea marcată cu C^{13} (izotop stabil, neradioactiv) sau C^{14} (izotop instabil, radioactiv), administrată pacienților sub formă de soluție, este rapid hidrolizată de urează cu formarea NH_4^+ și a CO_2. CO_2 marcat se absoarbe în sânge, este

transportat în plămâni şi se elimină în aerul expirat. Cuantificarea C^{13} se face prin metoda spectroscopiei de masă (foarte costisitoare). Metoda determinării C^{14} ese mai convenabilă. Detectarea *H. pylori* în scaun este metoda curentă de monitorizare a pacienţilor după tratament.

După infecţie, în serul pacienţilor se detectează IgM specific, iar ulterior, IgG şi IgA. Anticorpii persistă în ser şi în secreţia mucoasă, chiar după eradicarea infecţiei.

Patologie. H. pylori aderă la epiteliul mucoasei gastrice şi produce un răspuns inflamator local, cu eliberarea unei chemokine şi influxul leucocitelor. Majoritatea celor infectaţi nu dezvoltă simptome clinice, dar circa 5% prezintă unul dintre cele două răspunsuri, foarte diferite:

- la unii indivizi, infecţia cu *H. pylori* induce eliberarea excesivă a gastrinei din celulele epiteliului mucoasei, care stimulează secreţia de HCl din celulele parietale ale glandelor fundice şi dezvoltarea ulcerului;
- la alţii, inflamaţia cronică are efect opus, ducând la atrofia stomacului, asociată cu reducerea cantităţii de HCl şi creşterea riscului de carcinom gastric. Rareori, în infiltratul limfoid cronic al stomacului, din limfocitele B se dezvoltă limfomul MALT, dependent în evoluţia sa de stimularea antigenică cu *H. pylori* sau de citokinele proinflamatorii. După eliminarea eficientă a infecţiei cu *H. pylori*, limfomul MALT poate să regreseze.

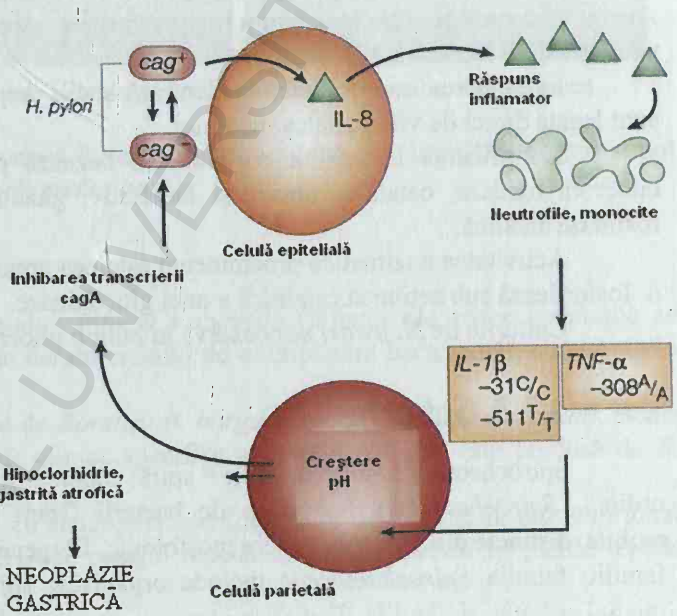


Fig. 297. Interrelaţiile dintre *H. pylori* şi organismul gazdă (după Peek şi Blaser, 2002).

Infecţia cu *H. pylori* induce un răspuns imun humoral sistemic şi local, care însă nu poate eradica infecţia, dar poate contribui la alterarea tisulară. Unii pacienţi dezvoltă un răspuns autoimun faţă de ATP-aza H/K din celulele parietale gastrice, care se corelează cu atrofia corpului gastric.

Epidemiologie. Rezervorul infecţiei este exclusiv uman: *H. pylori* se găseşte la circa 15% dintre persoanele sub 30 de ani, dar prevalenţa purtătorilor creşte odată cu vârsta. Se admite că bacteria se transmite de la persoană la alta, pe următoarele căi:

- calea oral-orală, prin intermediul picăturilor mici de salivă (aerosoli) contaminată datorită refluxului gastro-esofagian; *H. pylori* este prezentă în placa dentară a persoanelor cu infecţie gastrică;
- calea fecal-orală, prin materiile fecale infectate odată cu trecerea sucului gastric în intestin este principala cale de transmitere a infecţiei în ţările subdezvoltate. În materiile fecale s-a identificat ADN de *H. pylori*; apa şi alimentele vegetale contaminate pot fi vehicule de propagare a infecţiei;
- calea gastro-orală, prin vomă în timpul episoadelor de gastroenterită, pare a fi importantă pentru transmitere la copiii care trăiesc în condiţii precare de igienă. *H. pylori* a fost cultivat din vomă.

Gastroenterologii vin în contact cu secreţiile digestive ale bolnavilor şi astfel sunt mai expuşi riscului de infecţie.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Metronidazolul asociat cu sărurile de bismut ale acidului salicilic sau citric sterilizează circa 80% dintre pacienții infectați cu *H. pylori*.

Cultivare. H. pylori se cultivă pe medii speciale: bulion de cord-creier de vită, agarizat, cu adaos de sânge (5–10%), ser, gălbenuș de ou, amidon, albumină bovină sau cărbune. Recent au fost propuse sulfatul feros, piruvatul de sodiu și mucina de porc, isovitalex (2%) și hemina (10 mg/l). Se poate adăuga uree (20 g/l) și un indicator de pH (roșu fenol) pentru a identifica coloniile ureazo-pozitive. Totuși, o cantitate mare de uree poate să inhibe creșterea bacteriei prin creșterea pH. Pentru inhibiția creșterii microbiotei asociate, se folosește mediul selectiv suplimentat cu antibiotice (vancomicina, teicoplanina care inhibă cocii Gram pozitivi; polimixina, acidul nalidixic, colistinul, trimetoprimul sau cefsulodinul care inhibă bacilii Gram negativi și antifungice – nistatin sau amphotericina B). Creșterea optimă se înregistrează la pH 6,0–7,0, la 37°C, într-o atmosferă care conține 5% O_2 și 5–10% CO_2. Nu crește în aerul atmosferic și nici în anaerobioză. În culturile expuse la aerul atmosferic, celulele se fragmentează și apar forme cocoide, atipice. *H. pylori* supraviețuiește la pH mai mic de 4 și începe să crească la pH mai mare de 5.

Creșterea unor colonii mici, circulare, de tip S cu diametrul de 1 mm, este observată după 3–4 zile pe medii selective, cultivate din biopsii gastrice. Activitatea hemolitică nu se observă imediat, dar poate să apară la câteva zile, la 4°C.

Examinarea microscopică evidențiază bacili drepți sau curbați. Forma spiralată și mobilitatea sunt legate direct de vâscozitatea mediului.

Identificarea bacteriilor cultivate se bazează pe evidențierea prezenței anumitor enzime: citocrom oxidaza, catalaza, ureaza și facultativ, glutamil- transpeptidaza, leucin- aminopeptidaza, fosfataza alcalină.

Activitatea enzimatică proeminentă este cea ureazică. Singura sursă de C este glucoza, pe care o fosforilează sub acțiunea catalitică a unei glucokinaze.

Culturile de *H. pylori* se conservă în bulion glicerinat (glicerolul este agent crioprotector).

12.3. Spirochete

Spirochetele (lb. greacă, *spira* = spiră; *chaete* = fir de păr) formează un grup mare (cu statut de ordin – *Spirochaetales*), heterogen de bacterii Gram negative, chemoheterotrofe, spiralate, fine, mobile, distincte din punct de vedere morfologic, filogenetic și al tipului de mobilitate, grupate în două familii: familia *Spirochaetaceae* include organisme spiralate, mari, libere, răspândite mai ales în mediul acvatic și familia *Treponemataceae*, ce cuprinde spirochetele de interes clinic, aparținând genurilor *Treponema, Leptospira* și *Borrelia.*

Organitul de mobilitate este reprezentat de *filamente axiale* sau *endoflageli* cuprinși într-o *teacă periplasmică situată între teaca externă* și *protoplast* (fig. 298, 299).

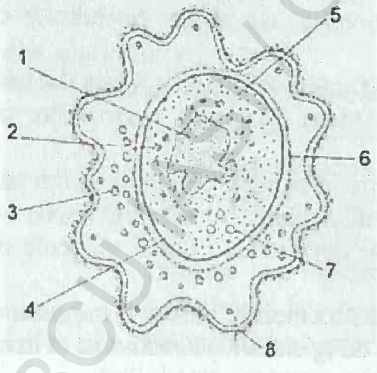


Fig. 298. Secțiune transversală printr-o spirochetă (1 – nucleoid, 2 – ribosomi, 3 – filamente axiale, 4 – teacă periplasmică, 5 – protoplast, 6 – perete celular, 7 – microtubuli, 8 – teaca externă) (http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chalmydias/spirochaetes.html).

Fig. 299. Structurile superficiale ale unei bacterii spiralate (1 – punctul de inserție al filamentelor axiale, 2 – filamente axiale, 3 – protoplast, 4 – teacă externă) (http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chalmydias/spirochaetes.html).

Endoflagelii conferă mobilitate ''în tirbușon'', ca o adaptare la deplasarea în medii vâscoase (mucoasa bucală, gastrointestinală, sedimente, mâl). Cînd endoflagelii se rotesc în aceiași direcție, se

prespune că cilindrul protoplasmatic se roteşte în direcţie opusă, asigurând astfel rotirea tecii externe în formă de tirbuşon şi deplasarea celulei bacteriene. Pe medii solide, endoflagelii determină mişcări de flexie şi îndoire a celulei bacteriene, care au ca rezultat deplasarea prin alunecare (fig. 300).

Deoarece sunt foarte fine, în stare vie aceste organisme se evidenţiază numai la microscopul cu fond întunecat (fig. 301).

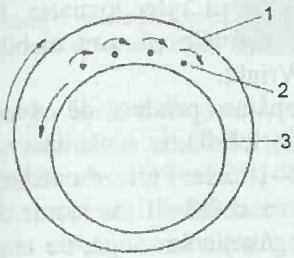


Fig. 300. Reprezentarea sensului de mişcare al componentelor unei bacterii spiralate (1 – protoplast, 2 – filamente axiale, 3 – teacă externă) (http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chalmydias/spirochaetes.html).

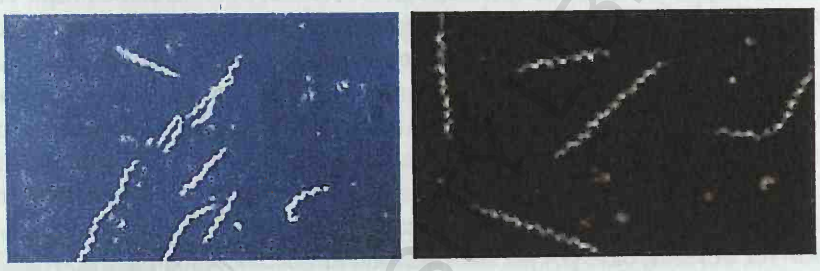


Fig. 301. Celule de *Leptospira,* observate la microscopul cu fond întunecat.

Spirochetele se pot transmite prin contact direct sau indirect (apă contaminată, vectori) şi pot produce boli venerice, antropozoonoze sau boli profesionale.

12.3.1. Genul *Borrelia*

Reprezentanţii genului *Borrelia* produc *infecţii recurente* (infecţii ale căror simptome se succed la diferite intervale de timp legate de durata ciclului de multiplicare bacteriană), cunoscute în clinică sub denumirea de *boala Lyme.*

S-au identificat cel puţin 3 subspecii de *Borelia: B. burgdorferi, B. afzelii* şi *B. garinii.* Boala Lyme, transmisă de căpuşe, cu manifestările clinice specifice agentului patogen este produsă de *B. burgdorferi.*

Borrelia se cultivă pe medii fluide cu sânge, ser sau fragmente de ţesut şi în oul embrionat (inoculare în membrana corioalantoidiană). După pasajul repetat *in vitro*, *Borrelia* îşi pierde repede virulenţa.

Boreliile sunt sensibile la uscăciune şi de aceea sunt total dependente de gazdă: ele s-au găsit numai la artropodele sau la gazdele vertebrate pe care seama cărora artropodele se hrănesc hematofag. *B. burgdorferi* este transmisă la om, de căpuşele ixodide (*Ixodes ricinus*).

B. burgdorferi este un organism flexibil, cu lungimea de 10–30 μm, cu 3—10 spire laxe, cu helixul de stânga (se roteşte antiorar). Pasul spiralei este de 2–4 μm, iar celulele se deplasează prin mişcări de rotaţie şi torsiune. Structural, la microscopul electronic, *Borrelia* este alcătuită dintr-o membrană (strat, teacă) externă trilaminară ce înconjoară spaţiul periplasmic în care se găsesc 7–11 flageli şi compartimentul intern – cilindrul protoplasmatic. *In vivo*, celula este tapetată cu un strat mucos amorf, alcătuit din componente ale gazdei, pierdut uşor prin spălare. Un înveliş asemănător se găseşte pe suprafaţa *T. pallidum.*

Membrana (teaca) externă, cu o structură trilaminară, este alcătuită din proteine, lipide şi glucide. *In vitro*, în prezenţa anticorpilor specifici şi a complementului, membrana externă formează vezicule, o reflectare a senescenţei şi morţii celulare.

Proteinele majore ale membranei externe (A, B, C, D, E, F) asigură variabilitatea antigenică a agentului patogen.

Flagelii au inserţie subterminală, bipolară, la cilindrul protoplasmatic al *B. burgdorferi,* sunt aşezaţi paralel cu axul lung şi se suprapun în zona de mijloc a celulei. Filamentele flagelare de *B. burgdorferi* sunt alcătuite dintr-un singur tip de moleculă proteică, numită flagelină. Anticorpii anti-flagelină au titru crescut în toate stadiile infecţiei, dar nu sunt protectori.

Structurile genetice sunt neobişnuite: cromosomul este linear (910725 pb), iar plasmidele, în număr de 21 sunt atât lineare (12), cât şi circulare (9).

Borrelia poate fi cultivată pe mediu artificial, din sânge, lichid cefalorahidian şi din lichidul sinovial, dar mai ales din leziunile tegumentare de *eritema migrans* (EM). Se multiplică lent, timpul de generaţie fiind de 8–15 ore pentru *B. burgdorferi* şi de circa 26 ore pentru *B. recurentis*. Pasajele repetate pe mediul artificial modifică structura antigenică şi celulele îşi pierd infecţiozitatea. Pe preparatul proaspăt, la microscopul cu fond clar sau cu contrast de fază, celulele vii sunt mobile. *Borrelia* poate fi uşor evidenţiată pe frotiuri de sânge colorate Giemsa sau Wright.

Boala Lyme este iniţiată prin infecţia localizată a pielii după înţepătura produsă de căpuşa *Ixodes*. După perioada de incubaţie de 3–10 zile, debutul este abrupt, cu stare febrilă. În acest interval, *Borrelia* se găseşte în sânge. Febra persistă câteva zile, apoi scade pentru 4–10 zile. Perioada afebrilă este urmată de un nou atac febril, cu frisoane şi stare de rău general. Se succed 3–10 recurenţe. În perioadele febrile, care corespund unui ciclu de multiplicare, *Borrelia* se găseşte în sânge, de unde lipseşte în perioadele afebrile. Maladia se caracterizează prin leziuni tegumentare în expansiune denumite *eritema migrans* şi oboseală, dureri de cap, artralgie, mialgie, febră, rigiditate a gâtului. Diseminarea spirochetei din leziunile tegumentare poate produce manifestări clinice mai severe: meningită, blocaj atrio-ventricular cardiac etc. Maladia Lyme cronică este caracterizată prin *artrită, nevrită, cardită*, care pot persista luni sau ani de zile după infecţie (fig. 302).

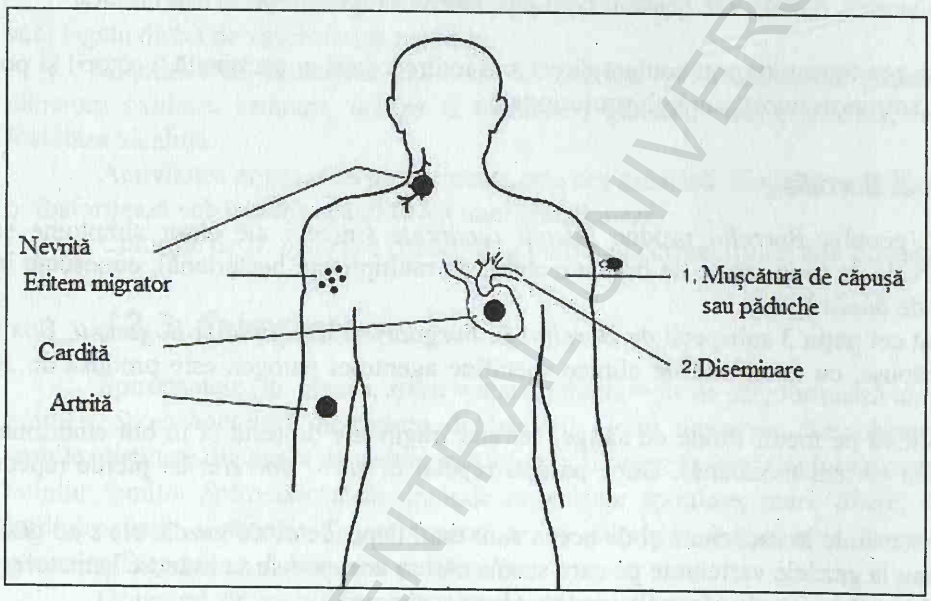


Fig. 302. Localizarea patologiei infecţiilor cu *Borrelia* (Baron, 1996).

În perioadele febrile este indusă sinteza anticorpilor specifici, iar recurenţa se încheie sub acţiunea anticorpilor care *in vivo* produc imobilizarea şi liza, iar *in vitro*, aglutinarea celulelor de *Borrelia*.

B. burgdorferi este transmisă la om prin injectarea cu saliva căpuşii. Bacteria aderă la glicozaminoglicanii membranei celulelor gazdei, iar ulterior migrează şi produce leziunile tegumentare caracteristice. Se disemineză pe cale limfatică sau prin sânge în musculatura striată şi în viscere.

Diagnosticul bolii Lyme este îngreunat de multitudinea simptomelor ce pot însoţi procesul infecţios. În intervalul febril se recoltează sânge. Pe frotiul colorat Giemsa, la microscopul optic se evidenţiază *Borrelia* cu spire largi, printre hematii (fig. 303).

Borrelia se poate evidenţia la microscopul optic după impregnare argentică sau prin microscopia cu fluorescenţă, cu anticorpi marcaţi (fig. 304, 305).

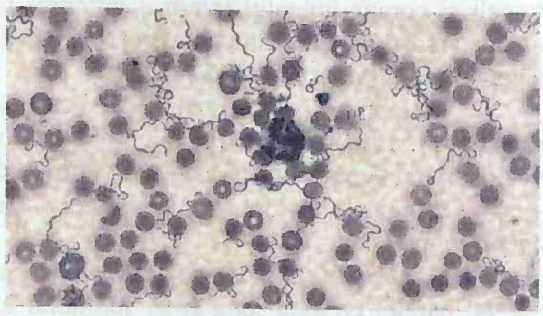


Fig. 303. Frotiu de sânge de şoarece colorat Giemsa cu spirochetemie masivă (Connoly şi Benac, 2005).

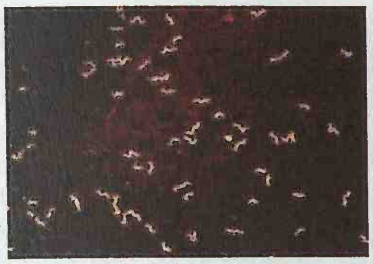


Fig. 304. Borrelia burgdorferi vizualizată prin tehnica imunofluorescenței (Schwan și Piesman, 2002).

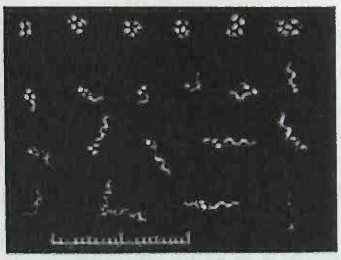


Fig. 305. Borrelia vizualizată prin metoda impregnării argentice (Dutton și Todd, 1905–1907, citați de Burgdorfer, 1999).

Pentru diagnosticul *in vivo*, proba de sânge de la pacientul infectat se injectează intraperitoneal la animalele sensibile (șoarece alb, șobolan tânăr, hamster). La aceste animale, *B. burgdorferi* se diseminează în țesuturi, dar nu produce procese patologice. Semnul distinctiv al bolii Lyme – artrita – se manifestă numai la rozătoarele cu sistem imunitar imatur sau compromis. Diagnosticul serologic este singura modalitate clinică de evidențiere a infecției cu *B. burgdorferi*. Pentru tratament se recomandă amoxicilină (3–4 g/zi) timp de 10 zile sau doxiciclină (200 mg/zi).

Spirocheta *B. hermsii* produce *febra recurentă*, caracterizată prin valuri febrile, separate de intervale asimptomatice (fig. 306). Episoadele febrile sunt produse de populații de *Borrelia* care se disting antigenic. Fiecare populație de celule bacteriene induce sinteza anticorpilor specifici neutralizanți. Întotdeauna rămâne o populație mică de celule bacteriene viabile, rezistente la acțiunea anticorpilor, deoarece sunt variante antigenice distincte de populația parentală.

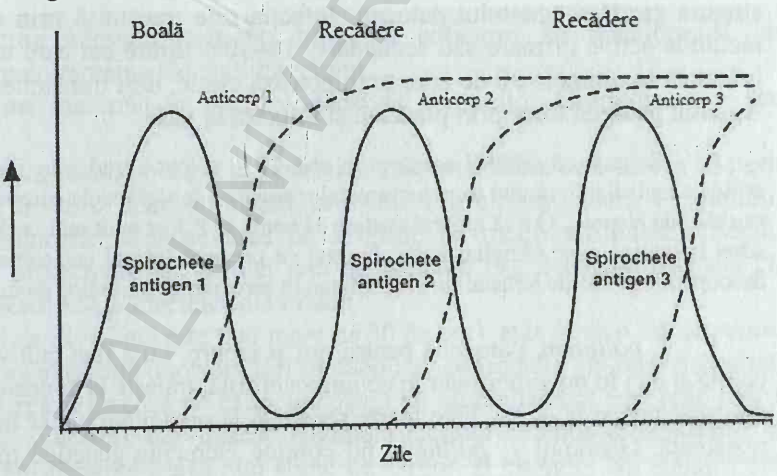


Fig. 306. Evitarea răspunsului imun umoral de către *Borrelia* prin mecanismul de variație antigenică (Baron, 1996).

Antigenul major al celulelor de *Borrelia* este o proteină majoră a membranei, cu caracter variabil (VMP), codificată de o familie de gene. Comutarea expresiei genelor acestei familii permite apariția, în timpul infecției, a unei mici populații de celule, care prin multiplicare va reface noua variantă antigenică (serotipică) de *Borrelia*, rezistentă la efectul anticorpilor.

La nivel individual, o singură celulă de *B. hermsii* are potențialul de a genera circa 40 de serotipuri diferite ale VMP. Rata de comutare a variantelor antigenice ale proteinei majore este de $1/10^3$–10^4.

VMP are rol important în localizarea tisulară a bacteriilor din g. *Borrelia*.

Proteina majoră de virulență prezintă variante distribuite în clase de molecule mari (37–40 kDa) și mici (19–22 kDa). Genele codificatoare sunt localizate pe plasmide lineare, care se găsesc în copii multiple.

În zonele geografice în care febra recurentă este endemică, rezervorul de infecție este populația de rozătoare. De la acestea, *Borrelia* este preluată de căpușele din genului *Ornithodorus*, în timpul hrănirii hematofage. La căpușe, *Borrelia* se transmite pe verticală, transovarian și se găsește în toate țesuturile. La om se transmite în timpul hrănirii hematofage sau prin strivirea căpușii pe leziunile tegumentare. Boala transmisă de căpușe nu este contagioasă. Păduchii se infectează odată cu sângele cu care se hrănesc. După 4-5 zile, la o nouă hrănire, păduchele este sursă de infecție pentru alți indivizi umani, care se contaminează prin strivirea artropodului la locul leziunii tegumentare după înțepare.

Evaluarea eficienței chimioterapiei este foarte dificilă, datorită variabilității remisiei spontane a febrei, însă se presupune că doze unice de tetraciclină, eritromicină sau penicilină sunt suficiente pentru neutralizarea unui atac individual de febră.

12.3.2. Genul *Treponema*

Speciile de *Treponema* patogene pentru om au fost reclasificate în 1984: *T. pallidum* (agentul sifilisului veneric) este înrudită cu alte specii de *Treponema* patogene care produc boli nevenerice, ce pot fi diferențiate prin manifestările clinice; *T. pallidum* subsp. *endemicum* (produce sifilisul endemic sau bejel, întâlnit în Africa, Orientul Mijlociu și Sud Estul Asiei, mai ales la copii, cu leziuni cutanate); *T. pallidum* subsp. *pertenue* (produce pianul, endemic în zonele tropicale, mai ales la copiii sub 15 ani, manifestat sub forma unor papule ulcerative la nivelul membrelor), *T. carateum* (pinta, endemică în Mexic, America Centrală și de Sud, Filipine și Pacific, produce leziuni papulare neulcerative, urmate de depigmentare și hipercheratoză) (Norris, 1993).

Deși treponemomatozele sunt considerate boli strict umane cu transmitere sexuală și transplacentară, specia *T. cuniculi*, identică din punct de vedere morfologic cu *T. pallidum*, produce o infecție cu transmitere sexuală la iepure, care se manifestă prin leziuni minore la nivelul organelor genitale.

T. pallidum este o bacterie Gram negativă, cu lungimea de 5–15 μm, fină, spiralată helicoidal, mobilă, printr-o mișcare de rotație în jurul endoflagelului. Sifilisul este o boală* cronică, iar omul este singura gazdă a agentului patogen. Infecția este transmisă prin contact direct, de obicei sexual, din leziunile active primare sau secundare. 16–30% dintre cei care au avut contact sexual cu o persoană infectată în ultimele 30 de zile, se infectează clinic, deși transmiterea propriu-zisă are o rată mai mare. Agentul patogen trece prin placentă și infectează fătul.

*Se pare că sifilisul a apărut în sec. 17 și a fost introdus în Europa de Cristofor Columb, cu difuzarea rapidă a maladiei în rândul trupelor armatelor angajate în războaiele europene (boala fiind cunoscută ca răul francez sau răul de Napoli). O altă ipoteză susține că boala ar fi fost mult mai veche, pe baza dovezilor arheologice care au adus la lumină oase (Anglia, Italia, Franța) ce prezintă leziuni caracteristice sifilisului. Agentul sifilisului a fost descoperit în 1905 de Schaudinn și Hofmann în serozitățile leziunilor secundare, sifilitice.

T. pallidum, patogenă pentru om și iepure, nu a fost cultivată pe medii artificiale, în culturi de celule și nici în oul embrionat. Este microaerofilă, trăiește la concentrația de 1–4% O_2, este distrusă rapid de uscăciune și la 42°C. Este foarte sensibilă la *penicilină*, chiar în concentrații mici, fără fenomene de rezistență. Genomul *T. pallidum* nu conține elemente genetice transpozabile (EGT), ceea ce explică stabilitatea și sensibilitatea agentului la penicilină. Deși bacteria este sensibilă la penicilină, infecția se cronicizează din cauza persistenței sifilisului primo-secundar (mai ales în cazul populațiilor defavorizate), care crește riscul transmiterii congenitale, rezistenței la tratament și agresivității bolii la bolnavii de SIDA.

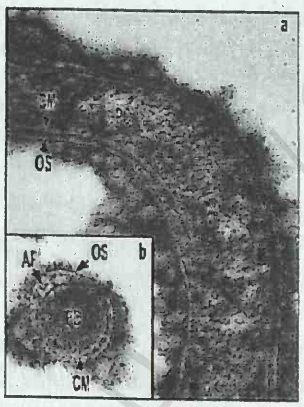


Fig. 307. Secțiune longitudinală ultrafină printr-o celulă de *T. denticola* (OS – teaca externă, CM – membrana citoplasmatică, PC – cilindru protoplasmatic) (Schultz și colab., 1998).

Celelalte specii de *Treponema* pot fi cultivate ușor în mediul lichid, în condiții anaerobe sau microaerofile.

Structura. La exteriorul membranei citoplasmatice se găsește un strat subțire de peptidoglican ce conferă stabilitate structurală, un flagel periplasmic – *endoflagelul* și membrana externă (fig. 307).

Endoflagelul localizat în spațiul periplasmic permite mobilitatea caracteristică „de tirbușon" (fig. 308), are diametrul de 17 nm și se extinde pe mai mult de jumătatea lungimii celulei, în spațiul periplasmic, de la ambele capete ale celulei, spre zona de mijloc.

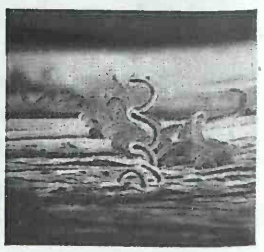


Fig. 308. Spirochete deplasându-se "în tirbușon" într-un mediu vâscos (http://biosink.blogspot.com/2008-05-18 archive.html).

Filamentul flagelar are o teacă externă şi o componentă centrală alcătuită din cel puţin 4 polipeptide, omologe flagelinei. La fiecare capăt al spiralei îşi au originea 2–4 endoflageli, care se răsucesc în jurul celulei pe măsură ce se extind spre zona de mijloc.

Flagelul periplasmic sau endoflagelul este componenta structurală cea mai bine caracterizată la *T. pallidum*. Filamentele flagelului celor mai multe bacterii sunt polimeri ai unei singure subunităţi peptidice. În contrast, filamentul endoflagelar la *T. pallidum* este alcătuit din câteva proteine. Membrii grupului *Treponema*, conţin, de asemenea, filamente citoplasmatice, denumite fibrile, cu aspect de bandă (cu lăţimea de 7–7,5 nm), ce se întind pe lungimea celulei, chiar sub membrana citoplasmatică, paralele cu flagelul periplasmic. Funcţia lor nu este cunoscută.

Endoflagelul îşi păstrează configuraţia helicală după ce este eliberat în spaţiul periplasmic prin tratamentul cu detergenţi, ceea ce arată că aspectul spiralat este o proprietate structurală stabilă a endoflagelului şi nu depinde de asocierea cu corpul celulei. Fiecare proteină a flagelului este codificată de o genă proprie.

Teaca externă a celulei de *T. pallidum* este alcătuită în primul rând din glicozaminoglicani şi săracă în structuri proteice. Cardiolipina este un compus important al tecii externe. Membrana externă la *T. pallidum* conţine un număr foarte mic de proteine membranare interne. Dintre proteinele asociate membranei, multe sunt complexate cu lipidele (lipoproteine) şi sunt ancorate în membrana de *T. pallidum* prin componenta lipidică, asemănător altor lipoproteine bacteriene. Asociate membranei citoplasmatice sunt proteinele care leagă penicilina (PBP) şi sunt probabil implicate în sinteza peptidoglicanului.

Serul uman normal conţine adeseori cantităţi mici de anticorpi ce reacţionează cu polipeptidele de *T. pallidum* şi cu unele proteine ale endoflagelului.

Genomul este de câteva ori mai mic (1,14 Mb) decât al bacteriilor Gram pozitive sau Gram negative.

Fiziologie. T. pallidum este un parazit obligat al omului şi este una dintre cele câteva bacterii patogene care nu au fost cultivate *in vitro*. Este propagată prin infecţia intratesticulară a iepurelui, pentru scopuri de cercetare şi diagnostic. Incapacitatea de a creşte pe medii artificiale reflectă, probabil, dependenţa de sistemele protectoare ale celulei faţă de radicalii O_2, deoarece necesită O_2 pentru metabolism, dar este foarte sensibilă la efectele sale toxice.

Creşterea este lentă (timpul de diviziune este mai mare de 30 de ore), atât *in vivo*, cât şi pentru cele cultivate *in vitro*, ceea ce denotă existenţa unor limitări metabolice, consecinţe ale unor necesităţi neidentificate. *T. pallidum* metabolizează glucoza pe calea glicolizei cu un randament energetic foarte mic (2 molecule ATP/moleculă de glucoză), dar lipsesc enzimele ciclului acizilor tricarboxilici şi catena transportoare de electroni. Nu metabolizează alte surse de carbon şi energie. Nu sintetizează acizi graşi, pe care *T. pallidum* îi preia de la gazdă, dar posedă enzimele de conversie prin care moleculele gazdei sunt convertite în molecule proprii. Pentru preluarea macromoleculelor din mediu, *T. pallidum* posedă mecanisme speciale de transport. *T. pallidum* sintetizează ADN, ARN, proteine şi cel puţin anumiţi aminoacizi.

T. pallidum este negativă pentru testul producerii catalazei şi oxidazei, caractere ce se corelează cu condiţiile de microaerofilie necesare supravieţuirii *in vitro*. Enzimele sunt termolabile la temperatura corpului uman, ceea ce ar putea să explice rata scăzută de creştere a agentului patogen. Terapia sifilisului prin şoc termic a fost introdusă în 1918 şi a constat în administrarea sângelui de la pacienţii cu malarie (LaFond, 2004), urmată de tratamentul cu quinină.

Patogeneza. În condiţii naturale, *T. pallidum* infectează numai omul, singura gazdă naturală. Infecţia este transmisă prin contact sexual. Perioada de incubare este de 10–90 de zile, în funcţie de doza inoculată. *Doza infecţioasă 50* pentru iepurele inoculat intratesticular este de 57 de celule bacteriene. O persoană infectată poate să rămână contagioasă 3–5 ani. Infecţia mai veche de 5 ani nu este contagioasă.

T. pallidum este foarte invazivă: *in vitro* se ataşează rapid, prin una sau ambele extremităţi, de celulele epiteliale, fibroblastice, endoteliale umane şi de iepure. Structura celulară de aderenţă este matricea extracelulară, în primul rând fibronectina. *In vivo, T. pallidum* penetrează joncţiunile celulelor epiteliale ale mucoasei genitale, progresând prin mişcarea de rotaţie în jurul axului longitudinal („în tirbuşon"), uşurată de eliberarea hialuronidazei într-un material vâscos.

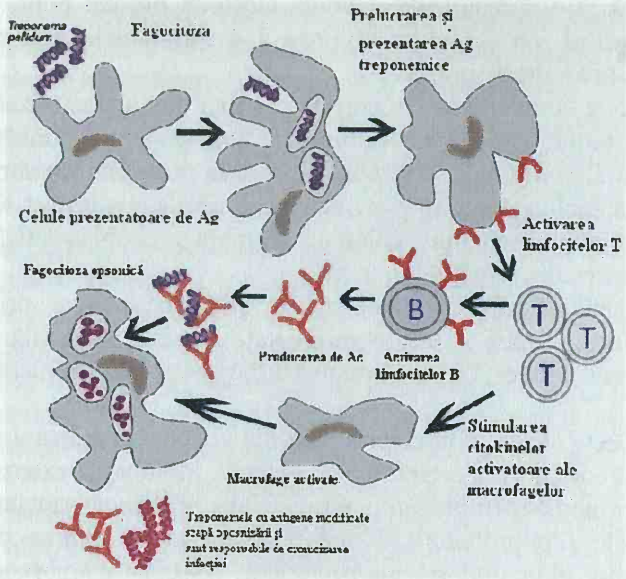


Fig. 309. Interacțiunea *T. pallidum* cu sistemul imunitar al gazdei. Explicații în text (www.metapathogen.com).

T. pallidum traversează celulele epiteliale și ajunge repede în sânge și în țesuturile profunde. În celulele dermului induce sinteza metaloproteazei-1 care degradează componentele matricei (MMP-1). Enzima degradează colagenul și ușurează pătrunderea agentului patogen în țesuturile profunde. La situsul infecției este activat răspunsul inflamator. Pe suprafața celulelor endoteliale este indusă expresia moleculelor de aderență: ICAM-1, VCAM-1 și selectina E. Reacția inflamatorie este săracă în neutrofile. Neutrofilele lizează agentul patogen pe care îl fagocitează. *T. pallidum* este înglobată de celulele dendritice (CD), localizate în derm, în mucoasa rectală, în țesutul cardiac (situsuri potențiale ale infecției). CD stimulate eliberează citokine proinflamatorii: IL-1β, IL-6, IL-12, TNFα.

CD funcționează ca o punte de legătură între imunitatea înnăscută și cea adaptativă, deoarece prezintă antigenele microbiene celulelor T din ganglionii limfatici. Celulele T sunt stimulate de antigenele lipoproteice ale membranei externe și de antigenele flagelare treponemice prezentate de CD (fig. 309). Celulele T ating densitatea maximă în focarul infecțios la 10–13 zile de la contactul contaminant, simultan cu macrofagele și mediază reacția de hipersensibilitate de tip întârziat față de *T. pallidum*.

Antigenele membranei externe și cele flagelare induc sinteza anticorpilor IgM și IgG.

T. pallidum se multiplică la locul inoculării, cu limfadenită regională moderată. Aproximativ 30% dintre cei infectați se vindecă spontan, fără leziuni clinice. Leziunea clinică *primară* denumită *șancru moale* apare la 3 săptămâni după expunere, este localizată pe tegument sau pe mucoasa aparatului genital, din care agentul patogen se disemenează. La bărbații homosexuali, leziunea primară este intrarectală, perianală, orală sau cu alte localizări interne, la cei heterosexuali este localizată pe penis, iar la femei, pe labia ori pe cervix. Din leziunea primară, *T. pallidum* se disemenează în ganglionii limfatici regionali și de aici în sânge. Leziunea primară este nedureroasă și de aceea diagnosticarea întârzie, se vindecă spontan, în 4–6 săptămâni. După acest interval, oriunde în organism, se dezvoltă leziunea *secundară*, *șancrul tare*, datorită procesului inflamator cu infiltrat limfocitar. Șancrul secundar progresează la ulcerație, dar nu este purulent.

Sifilisul secundar apare la ¼ dintre cazurile netratate și rezultă din multiplicarea *T. pallidum* în leziunile multiple tegumentare și viscerale, în competiție cu răspunsul imun humoral viguros. Leziunea secundară se vindecă spontan. În leziunile primare și secundare se găsește un număr mare de celule de *T. pallidum*, infecțioase. Manifestarea cea mai comună a sifilisului secundar este o erupție eritematoasă mucocutanată diseminată. Rareori leziunile devin necrotice (sifilis malign). De cele mai multe ori leziunile secundare nu sunt evidente. În stadiul secundar, *T. pallidum* s-a găsit în biopsiile din ficat, iar complexele Ag-Ac se depun în glomerulii renali și produc glomerulonefrită.

Deși aparent se vindecă spontan, leziunile pot reveni după 2–10 ani. La alte 30% dintre persoanele infectate, infecția cu *T. pallidum* poate să rămână inaparentă și să parcurgă stadiile primar și secundar fără leziuni clinice, dar pacienții dezvoltă, la câțiva ani sau chiar câteva decade după infecția inițială, leziunile *sifilisului terțiar*, cu granuloame (gome sifilitice) în tegument, oase, ficat, leziuni degenerative ale SNC (pareză, tabes) sau cu leziuni cardiovasculare (anevrism aortic, insuficiență valvulară aortică), cu puține celule infecțioase (fig. 310, 311).

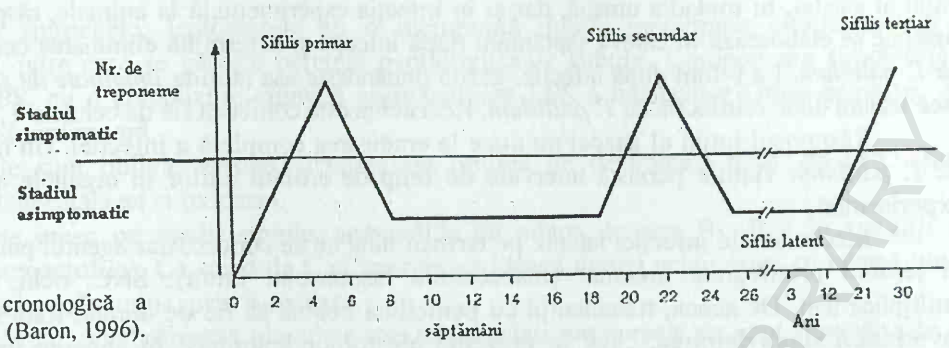


Fig. 310. Evoluția cronologică a infecției cu *T. pallidum* (Baron, 1996).

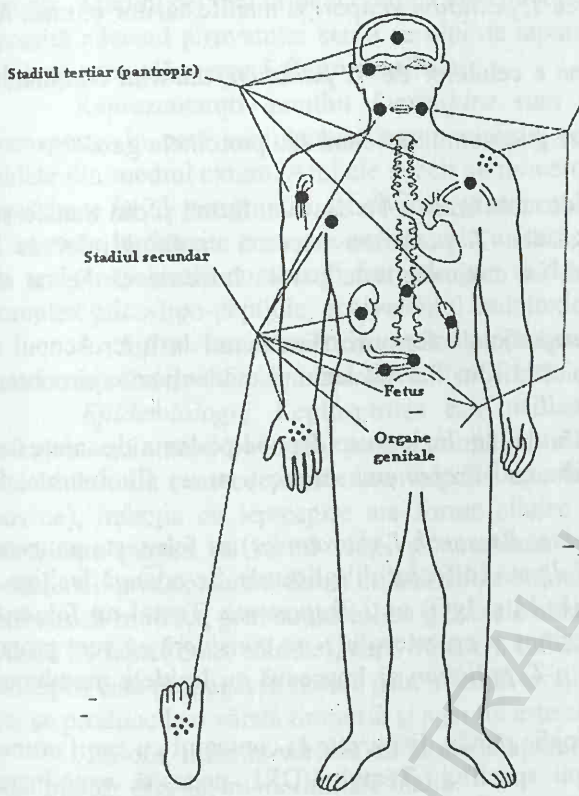


Fig. 311. Localizarea infecției cu *T. pallidum* (Baron, 1996).

Complicațiile neurologice sunt asociate cu sifilisul terțiar, dar *T. pallidum* pătrunde în SNC foarte timpuriu. Neurosifilisul este asociat totdeauna cu creșterea numărului de leucocite și a cantității de proteine în LCR. Uneori, în LCR se detectează agentul infecțios. Leziunea neurologică tipică, *tabes dorsalis*, apare la 20–30 de ani de la infecție și constă în degenerarea substanței albe a cordoanelor posterioare ale măduvei spinării și a ganglionilor rădăcinii dorsale.

Sifilisul se transmite la făt, în intervalul 10–15 săptămâni de sarcină. Rezultatul poate fi moartea fătului sau dacă naşterea este la termen, în copilărie apar semnele infecției: cheratită, anomalii ale SNC.

La pacienții HIV/SIDA, sifilisul provoacă șancruri multiple și extensive, cu evoluție rapidă spre neurosifilis.

Sifilisul pare a fi în primul rând o infecție invazivă. Cea mai mare parte a patologiei se datorează reacției inflamatorii indusă de agentul infecțios.

Evitarea răspunsului imun. Răspunsul imun este activat curând după infecție, înainte de stadiul clinic, contrar conceptului răspunsului imun "lent" în infecția cu *T. pallidum*. În stadiile primar și secundar se sintetizează IgM și IgG, cu rol opsonizant. Titrul IgM diminuează în stadiile tardive ale infecției și după tratament. IgM și IgG par să recunoască același grup de proteine de *Treponema*. Evoluția clinică foarte îndelungată a sifilisului se datorează capacității *T. pallidum* de a evita răspunsul

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

imun al gazdei. În maladia umană, dar şi în infecţia experimentală la animale, răspunsul imun local şi sistemic se elaborează în câteva săptămâni după infecţie şi determină eliminarea celor mai multe celule de *T. pallidum*. La 6 luni după infecţie, gazda dobândeşte aşa numita *imunitate de şancru*, adică nu mai face leziuni după reinfecţia cu *T. pallidum*. Rezistenţa este conferită fie de celulele T, fie de anticorpi.

Răspunsul imun al gazdei nu duce la eradicarea completă a infecţiei. Un număr mic de celule de *T. pallidum* viabile persistă intervale de timp de ordinul anilor în organele animalelor infectate experimental.

Mecanismele infecţiei latente pe termen lung nu se cunosc, dar agentul patogen se localizează în ţesuturi privilegiate imunitar (inaccesibile răspunsului imun): SNC, ochi, placentă, unde se multiplică lent. De aceea, tratamentul cu penicilină trebuie să fie de durată. Rata scăzută a diviziunii favorizează supravieţuirea, chiar în prezenţa efectorilor imunitari. În anumite localizări anatomice, factori locali neidentificaţi favorizează multiplicarea *T. pallidum* şi apariţia manifestărilor clinice. Alţi factori favorizanţi ai infecţiei latente sunt:

- antigenitatea slabă a suprafeţei externe a celulelor de *T. pallidum*, datorită conţinutului proteic scăzut al membranei externe;
- mascarea suprafeţei *T. pallidum* de către glicozaminoglicanii sau proteinele gazdei;
- localizarea intracelulară.

La *T. pallidum* funcţionează un mecanism de mobilizare a Fe din lactoferină şi din transferină, proteinele care sechestrează Fe în organismul gazdei. *T. pallidum* necesită cantităţi mici de Fe deoarece nu are catenă transportoare de electroni, iar enzimele sale par să înlocuiască Fe cu alte metale (Zn, Mg).

Diagnosticul se pune pe baza leziunilor superficiale timpurii. Examenul la microscopul cu fond întunecat, cu obiectivul de imersie, al unei picături din fluidul leziunii evidenţiază spirochetele mobile. În ser se identifică prezenţa anticorpilor specifici.

Testul imunofluorescenţei. O picătură din fluidul din leziune se depune pe lama de microscop şi se usucă la aer. Lama se acoperă cu ser specific anti-*Treponema*, marcat cu un fluorocrom. Se examinează la microscopul cu fluorescenţă.

În reacţia *serologică* VDRL (*Veneral Diseases Research Laboratories*) se foloseşte antigenul lipidic extras din ţesutul cardiac de bovine – *cardiolipina* (difosfatidil-glicerol). Se adăugă lecitina şi colesterolul pentru a stimula reacţia cu anticorpii (Ig M şi IgG) anti-*Treponema*. Testul nu foloseşte antigene de *T. pallidum*. Lipidele – cardiolipina, lecitina şi colesterolul – se consideră că sunt proprii gazdei, dar sunt încorporate în membrana externă a *T. pallidum* şi împreună cu lipidele membranei externe configurează tabloul antigenic.

Principiul reacţiei: particulele de antigen lipidic rămân dispersate la contactul cu serul normal dar floculează după ce se combină cu anticorpii specifici. Testul VDRL necesită examinarea microscopică pentru evidenţierea floculării. La persoanele netratate, testul devine pozitiv la 2-3 săptămâni după infecţie, are titru înalt în faza sifilisului secundar şi devine negativ la 6-18 luni după tratamentul eficient cu penicilină.

Testul cu antigen cardiolipinic dă uneori rezultate fals pozitive: anticorpii anti-cardiolipină sunt induşi de infecţia cu malarie, leproză, rujeolă, mononucleoză infecţioasă, LED, dezordini reumatice.

Testul imobilizării *T. pallidum* (TPI) constă în aceea că serul pacienţilor infectaţi inhibă mobilitatea agentului patogen, în prezenţa complementului activ din serul de cobai.

Testul imobilizării a fost înlocuit de testul *imunofluorescenţei indirecte*, care utilizează IgG de iepure anti-IgG umană pentru a evidenţia IgG legată de *T. pallidum*.

12.3.3. Genul Leptospira

Leptospirele sunt spirochete cu lungimea de 5-15 μm, fine, flexibile, spiralate helicoidal, cu turele de spiră strânse. Capetele celulei sunt rotunjite şi ambele sau numai unul se curbează şi formează structuri de forma unui cârlig, cu rol în perforarea ţesuturilor. Sunt mobile, cu mişcări "în tirbuşon", în profunzime şi deplasare limitată în spaţiu, ca rezultat al celor doi endoflageli inseraţi la extremităţile celulei, în spaţiul periplasmic. Leptospirele au două tipuri de mişcare: de translaţie (contracţie şi răsucire, cu deplasare) şi mişcarea de flexie-extensie (fără deplasare).

Ca şi alte spirochete, leptospirele au o membrană dublă: membrana citoplasmatică şi membrana externă, între care se găseşte peretele peptidoglicanic subţire. Componenta structurală a membranei este LPS, cu o compoziţie chimică asemănătoare LPS a bacteriilor Gram negative, dar activitatea toxică este inferioară.

Leptospirele sunt obligat aerobe, temperatura optimă de dezvoltare fiind 28–30°C. Sunt pozitive pentru testele catalazei şi oxidazei.

Leptospirele cresc pe medii simple, semisolide cu adaos de ser, B_2, B_{12}, în condiţii de aerobioză (sunt microaerofile). Ca sursă de C şi energie, oxidează numai acizii graşi cu catenă lungă de atomi de C, legaţi cu albumina, prin β-oxidare.

Leptospirele nu metabolizează glucidele sau aminoacizii, iar sursele de azot sunt sărurile de amoniu. Mediul cel mai utilizat conţine acid oleic-albumină serică bovină şi TWEEN 80. Unele tulpini necesită adaosul piruvatului sau a serului de iepure. Creşterea contaminanţilor din proba clinică este inhibată prin adăugarea 5-fluorouracilului.

Reprezentanţii genului *Leptospira* sunt distribuiţi în două specii: *L. interogans*, cu 8 genospecii, în care sunt incluse toate tulpinile patogene; *L. biflexa* cuprinde tulpinile saprobionte izolate din mediul extern. Ambele specii au numeroase variante antigenice (serologice). Tulpinile sunt repartizate în 23 serogrupuri subdivizate şi mai mult de 220 serovaruri. *L. interrogans* izolată de la om şi animale în diferite zone geografice este unitară din punct de vedere antigenic. Tulpinile izolate au un antigen somatic cu specificitate de gen şi dau reacţii serologice încrucişate. Antigenul este un complex glico-lipo-peptidic, echivalentul endotoxinei bacteriene.

L. biflexa se deosebeşte prin capacitatea de creştere în prezenţa 8-azaguaninei şi prin generarea celulelor sferice în mediu cu NaCl 1M.

Epidemiologie. Leptospiroza este o zoonoză cu distribuţie ubicvitară. Leptospirele sunt infecţioase, în mod obişnuit, pentru animalele sălbatice şi domestice, în special în tubii contorţi ai rinichiului. La şoarece şi şobolan, infecţia este foarte uşoară. La animalele domestice (câine, porc, bovine), infecţia cu leptospire are forme clinice mai grave, dar după însănătoşirea clinică, rămân purtătoare pentru tot restul vieţii şi constituie izvoare de infecţie pentru om. Omul este infectat ocazional, prin contactul direct cu animalele bolnave sau purtătoare sau cu excretele acestora. Omul se infectează indirect, prin contactul cu gazda de menţinere (şoarece, şobolan, iar pentru unele serotipuri, vacile de lapte, oaia, câinele), care transferă infecţia la animalele domestice (câine) şi la om. Agentul infecţios este propagat în natură prin infecţia cronică a tubilor renali ai gazdelor de menţinere. Infecţia lor se produce la o vârstă timpurie şi agentul este eliminat cronic.

La om, infecţia variază de la cea inaparentă (subclinică), până la sindromul sever al infecţiei mai multor organe, cu mortalitate înaltă.

Infecţia omului este ocupaţională sau recreaţională şi se datorează deversării agentului infecţios din urina animalelor purtătoare de leptospire, în mediul acvatic. Incidenţa este semnificativ mai mare în zonele calde, deoarece *Leptospira* îşi păstrează mai bine viabilitatea în mediul cald şi umed. Inhalarea aerosolilor contaminaţi poate duce la infecţia pe calea mucoasei tractului respirator. Leptospira rămâne viabilă în apele stagnante pentru câteva săptămâni. Consumul apei şi alimentelor contaminate, scăldatul favorizează transmiterea la om. Copiii se infectează mai frecvent de la câini. Contactul direct cu animalele infectate explică infecţiile fermierilor, veterinarilor, lucrătorilor din abator. Rareori, infecţia se datorează muşcăturii animalelor.

Agentul patogen pătrunde prin leziunile tegumentare, sau chiar prin tegumentul intact expus un timp îndelungat umidităţii, prin mucoasa orală sau prin conjunctivă. Ingestia ca rută de infecţie este de importanţă secundară.

Contactul indirect cu agentul patogen constituie un risc de infecţie pentru lucrătorii din mediile acvatice (orezării, exploatările de trestie de zahăr).

Patologie. Marea majoritate a infecţiilor cu *L. biflexa* sunt fie subclinice, fie sunt forme uşoare, fără să necesite asistenţă medicală. O proporţie mică dintre ce infectaţi fac febră bruscă, asociată cu alte simptome: dureri de cap, frisoane, mialgie, mai rar erupţie tegumentară. Aceasta este faza de bacteriemie. Sindromul anicteric durează circa o săptămână. Dispariţia simptomelor coincide cu sinteza anticorpilor.

Din sânge, *Leptospira* trece în organele interne, în special în ficat, unde poate determina manifestări severe, cu icter, dar şi în meninge, plămân, miocard, globul ocular. Leptospiroza icterică este o formă severă de infecţie. Icterul nu este asociat cu necroza hepatocitelor, iar după vindecare, funcţia hepatică revine la normal.

După circa 8 zile de la infecţie, *Leptospira* se localizează în tubii contorţi ai rinichiului şi determină insuficienţa renală acută.

Leziunile histopatologice se evidenţiază în ficat, rinichi, cord, plămân (fig. 312). În rinichi, nefrita interstiţială este asociată cu infiltratul intens al neutrofilelor şi monocitelor. Bordura în perie a celulelor tubulare este dezorganizată, cu scăderea numărului de mitocondrii. Leziunile hepatice sunt nesemnificative, dar poate apărea colestaza intrahepatică. Hiperplazia celulelor Kupffer este evidentă, chiar cu eritrofagocitoză. În muşchii striaţi ai piciorului poate să apară necroza focală a fibrelor musculare.

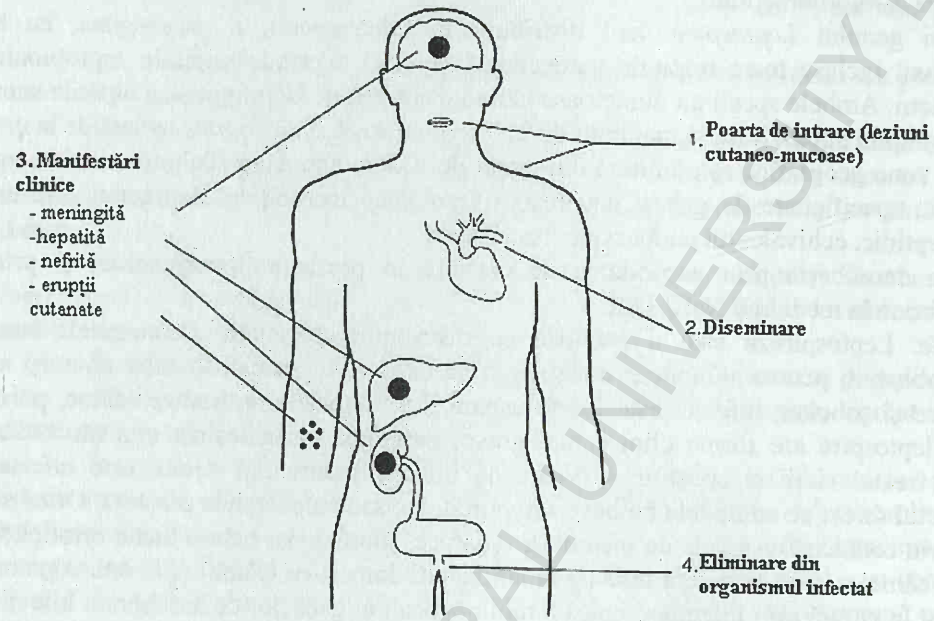


Fig. 312. Localizarea leptospirozei (Baron, 2006).

Patogeneza. Mecanismele prin care *L. biflexa* produce starea de boală nu sunt cunoscute. LPS are activitate endotoxică uşoară şi ar putea să medieze procesul patologic, cel puţin la variantele antigenice cu virulenţă mai mare. Leptospira aderă, *in vitro*, la celulele epiteliului renal. Aderenţa este stimulată de concentraţia subaglutinantă a anticorpilor specifici. Macrofagele fagocitează celulele de *Leptospira* opsonizate cu anticorpi. Neutrofilele nu omoară agentul infecţios.

În stadiul al doilea al infecţiei (stadiul imun), are loc sinteza anticorpilor, care coincide cu dispariţia celulelor de *Leptospira* din sânge şi a simptomelor. Severitatea maladiei nu se corelează cu gradul leziunilor tisulare, ci cu cantitatea de complexe imune circulante.

LPS este foarte imunogen şi determină specificitatea serologică a diferitelor variante antigenice. *In vitro*, anticorpii se evidenţiază în reacţia de aglutinare cu celule de *Leptospira* vii sau omorâte sau în reacţia de fixare a complementului.

Imunitatea este predominant humorală, mediată de anticorpii specifici anti-LPS, iar IMC este represată, fapt care se reflectă în diminuarea numărului de limfocite TCD_4 şi în capacitatea de răspuns la mitogeni.

Diagnosticul. Evidenţierea microscopică (la microscopul cu fond întunecat, prin metoda imunofluorescenţei sau la microscopul cu fond clar după colorare) în probe are avantajul rapidităţii (fig. 313).

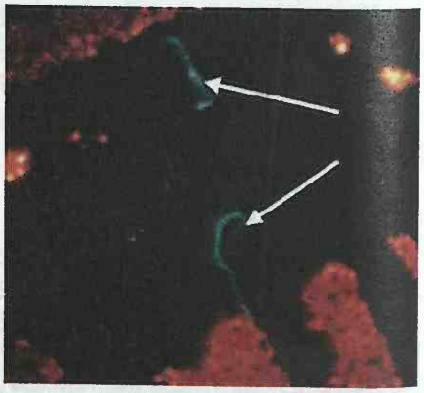


Fig. 313. L. interrogans în urină evidenţiată prin metoda imunofluorescenţei (Hornsby citat de Zuerner, 2006).

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Sângele recoltat cu heparină, LCR sau ţesuturile se folosesc pentru prepararea frotiurilor care se colorează Giemsa. Examenul urinii la microscopul cu fond întunecat oferă rezultate concludente. Este necesară o densitate de circa 10^4 celule de *Leptospira*/ml pentru ca o celulă să fie vizibilă în câmpul microscopului cu fond întunecat.

Detectarea antigenelor de *Leptospira* prin metoda RIA sau ELISA în proba clinică are o specificitate mai înaltă decât microscopia cu fond întunecat.

Diagnosticul serologic se foloseşte cu cea mai mare frecvenţă: anticorpii se detectează în ser la 5–7 zile după declanşarea simptomelor. Antigenele de *Leptospira* pot avea specificitate de gen sau de grup. Anticorpii produc aglutinarea celulelor de *Leptospira* în mediu lichid, detectabilă la microscop.

Izolarea. Leptospira apare în sânge, în primul stadiu al infecţiei, înainte de declanşarea simptomelor şi dispare la sfârşitul primei săptămâni a stadiului acut. Cultivarea probei de sânge trebuie să se facă cât mai repede: 1–2 picături de sânge se inoculează în 10 ml de mediu semisolid, cu adaos de 5-fluorouracil. În prima săptămână, *Leptospira* se poate izola din LCR. Proba de urină se poate cultiva la începutul săptămânii a II-a a bolii simptomatice, deoarece durata excreţiei urinare poate dura câteva săptămâni. *Leptospira* supravieţuieşte un interval limitat în urină şi de aceea se impune prelucrarea rapidă a probei: centrifugarea, resuspendarea sedimentului în TFS şi inocularea. Incubarea se face la 28–30°C.

Creşterea este lentă şi necesită examinarea săptămânală la microscopul cu fond negru, timp de circa 13 săptămâni. Tratamentul se realizează cu peniciline sau tetracicline (doxiciclină, minociclină).

Spirochetele din cavitatea bucală (*Borrelia bucalis*) sau cele care populează organele genitale (*B. refringens*) sunt saprobionte, strict anaerobe.

Spirillum minor produce febra muşcăturii de şobolan (febra Sodoku). Agentul patogen este inoculat prin muşcătura de şobolan şi produce adenopatie regională, erupţie eritematoasă tegumentară şi febră recurentă.

Bibliografie selectivă

1. Buck G. E. 1990. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Clin. Microbiol. Rev. 3: 1–12.
2. Brooks G. F., Caroll K.C., Butel J.S., Morse S.A. 2007. Jawets, Melnick & Adelberg Medical Microbiology, 24th Edition, Mc Graw Hill – Lange International Edition.
3. Primm T. 2002. Cholera Toxin Mechanism of Action. ASM microbelibrary.org
4. EFSA. 2010. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. EFSA Journal. 2010; 8:1437. 89 pp.
5. Euzéby, J. P. 2010. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Campylobacter. http://www.bacdico.net
6. FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization]. 2009. Salmonella and Campylobacter in chicken meat: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 19. Rome. May 2009. 69pp.
7. Moore J. E., Deborah Corcoran, Dooley J. S. G., Fanning S., Brigid Lucey, Matsuda M., McDowell D. A., Mégraud F., Millar B. C., Rebecca O'Mmahony, Lisa O'Riordan, Michele O' Rourke, Rao J. R., Rooney P. J., Sails A., Whyte P. *Campylobacter*. Vet. Res. 2005; 36: 351–382.
8. Ng L-K, Sherburne R, Taylor DE, Stiles ME. 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. J Bacteriol. 164:338–343.
9. Peek R. M., Jr., Blaser M. J. 2002. H*elicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nature Reviews Cancer 2: 28–37.
10. Alam M. 2009. Serogroup, Virulence, and Genetic Traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the Estuarine Ecosystem of Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 75(19): 6268–6274
11. Burdette D. L. et al. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. PNAS. 105(34): 12497–12502
12. Burdette D. L., Yarbrough M. L., Orth K. 2009. Not without cause: *Vibrio parahaemolyticus* induces acute autophagy and cell death. NIH Public Access 5(1): 100–102
13. Bates T. C., Oliver J. D. 2004. The Viable But Nonculturable State of Kanagawa Positive and Negative Strains of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Microbiol. 2004, 42(2):74–79
14. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Parts A–C
15. Charles A., Janeway Jr, Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shomchik. 2005. Immunobiology, 6th edition, Garland Science Publishing.
16. Cummings R. D., Esko J. D. 2009. Principles of Glycan Recognition. 2nd Edition. Essential of Glycobiology. CSH press
17. Spangler D. 1992. Structure and Function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol. Rev.56(4) : 662–647.

18. Del Giudice G., Covacci A., Telford J. L., Montecucco C., Rappuoli R. 2000. The Design Vaccines against *Helicobacter pylori* and their Development - Annu. Rev. Immunol. 19: 523–563.
19. Dunn B. E., Cohen H., Blaser M. J. 1997. *Helicobacter pylori* Clin. Microbiol. Rev.10: 720–741.
20. Edited by: Garrity, George M.; Brenner, Don J.; Krieg, Noel R.; Staley, James R. © 2005 Springer – Verlag
21. Fabbri A et al. 1999. *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin Modulates Cytoskeletal Organization and Calcium Homeostasis in Intestinal Cultured Cells. Infection and Immunity 67(3): 1139–1148
22. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17ed. Updates. 2000: Therapy of *Helicobacter pylori*: Current Status and Issues
23. Wassernaar T. M. 1997. Toxin Production by Campylobacter spp. Clin. Microbiol. Rev. 10: 466–476.
24. Yeung P. S. M., Boor K. J. 2004. Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Foodborne *Vibrio parahaemolyticus*. Infections, Foodborne Pathogens and Disease 2004, 1(2): 74–88
25. Nair B. G. et al. 2007. Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. Clin. Microbiol. Rev. 20(1):39–48
26. Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P. 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis - Clin. Microbiol. Rev. 18: 484–509.
27. Baron S., editor. Medical Microbiology. 4th edition. 1996.
28. Baughn R. E. Musher, D. M. 2005.Secondary Syphilitic Lesions Clin. Microbiol. Rev. 18: 205–216.
29. Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. – Jawets, Melnick & Adelberg Medical Microbiology. 2007. 24th Edition, Mc Graw Hill – Lange International Edition.
30. Burgdorfer Willy. 12th International Conference on Lyme Disease and Other Spirochetal and Tick-Borne Disorders, 1 – April 9, 1999. Keynote Address – The Complexity of Vector-borne Spirochetes (*Borrelia* spp).
31. Connolly S. E., Benach J. L. 2005. The versatile roles of antibodies in *Borrelia* infections. Nature Reviews Microbiology 3, 411–420
32. http://biosink.blogspot.com/2008_05_18_archive.html
33. La Fond R. E., Lukehart S. A. 2006. Biological Basis for Syphilis Clin. Microbiol. Rev. 19: 29–49.
34. Levett P. N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14: 296–326.
35. Norris S. J. 1993. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. Treponema Pallidum Polypeptide Research Group – Microbiol. Rev. 57(3): 750–779.
36. Schell R. F., Callister S. M. 1999. Borrelia, Infection and Immunity in vol. Encyclopedia of Immunology. Ed. Peter Delves, Ivan M. Roitt, AP.
37. Schultz C. P., Wolf V., Lange R., Mertens E., Wecke J., Naumann D., Zahringer U. 1998. Evidence for a New Type of Outer Membrane Lipid in Oral Spirochete *Treponema denticola*. FUNCTIONING PERMEATION BARRIER WITHOUT LIPOPOLYSACCHARIDES. The Journal of Biological Chemistry, 273, 15661–15666.
38. Schwan T. G., Piesman J. 2002. Vector Interactions and Molecular Adaptations of Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes Associated with Transmission by Ticks Perspective 8, No. 2
39. Sigal L. H. 1997. Lyme Disease: A review of Aspects of Its Immunology and Immunopathogenesis – Annu. Rev. Immunol. 15: 63–92.
40. Szczepanski A., Benach J. L. 1991. Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi* – Microbiol. Rev. 55(1): 21–34.
41. www.metapathogen.com
42. Zuerner R.L. 2006. Laboratory Maintenance of Pathogenic Leptospira. Current Protocols in Microbiology February, http://www.currentprotocols.com/protocol/mc12e01
43. Sigal L. 1997. Lyme Disease: A review of Aspects of Its Immunology and Immunopathogenesis. Annu. Rev. Immunol.15: 63–92.
44. Szczepanski A., Benach J. L. 1991. Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. Microbiol. Rev. 55(1): 21–34.
45. Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. Clin. Microbiol. Rev. 18: 484–509.
46. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_ulcer_diagram.png
47. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_virulence_factors_en.png
48. http://www.diasource-diagnostics.com/en/Products/Rapid-Tests/Gastrointestinal-Metabolism/Helicobacter-Pylori-Hpylori/Hpylori-Card-20-tests
49. http://www.tjclarkinc.com/bacterial_diseases/cholera_vibrio_cholerae.htm
50. *Mégraud F., Lehours P. 2007.* Helicobacter pylori *Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Reviews. 20, 2: 280–322*
51. Olson T. R., Pawlina W. 2008. A.D.A.M. Student Atlas of Anatomy. 2nd Edition.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13. BACTERII INTRACELULARE

Din punct de vedere imunologic, infecțiile produse de bacteriile intracelulare prezintă câteva particularități:

1. protecția față de bacteriile intracelulare este mediată de limfocitele T. Acestea nu interacționează direct cu agentul patogen, ci cu suprafața celulei infectate. Anticorpii au importanță nesemnificativă ca efectori ai protecției imunitare față de infecțiile intracelulare;
2. infecțiile produse de bacteriile intracelulare sunt însoțite de reacția de hipersensibilitate întârziată, care se manifestă după administrarea locală a antigenelor solubile, ca o reacție mediată de celulele T, ai cărei efectori sunt macrofagele;
3. reacțiile tisulare anti-bacterii intracelulare sunt *granulomatoase*. Atât reacțiile protectoare, cât și patologia sunt cauzate de granuloame. Ruperea granulomului favorizează diseminarea agentului patogen și extinderea leziunilor;
4. bacteriile intracelulare exprimă puțin sau de loc potențial toxic pentru celula gazdă, iar patologia este consecința activării răspunsului imun, mediat în primul rând, de limfocitele T. În contrast, bacteriile extracelulare secretă toxine, unele extrem de potente, care produc leziuni tisulare directe;
5. bacteriile intracelulare sunt bine adaptate: ele coexistă perioade lungi cu celula gazdă. Între infecția persistentă și imunitatea protectoare se dezvoltă un echilibru, rezultatul fiind o perioadă lungă de incubație și un proces infecțios cronic. Infecția este distinctă de procesul patologic. În contrast, bacteriile extracelulare produc infecții acute, care se declanșează curând după infecție și se încheie după ce răspunsul imun atinge o intensitate optimă.

Unele bacterii patogene sunt facultativ intracelulare, parcurgând în cursul ciclului infecțios o fază intracelulară, fără însă a fi strict dependente de mediul celular: *M. tuberculosis, M. bovis, M. leprae, S. enterica, Brucella* sp., *L. monocytogenes, Francisella tularensis*. Ele infectează în primul rând monocitul, dar și alte celule: de exemplu, *M. leprae* infectează celulele Schwann, iar *L. monocytogenes* infectează hepatocitele. Bacteriile parazite obligat intracelulare (*Chlamydia, Rickettsia*) nu supraviețuiesc în mediul extracelular al gazdei. Ele infectează celulele endoteliale și epiteliale, dar și monocitele.

Mecanismele invaziei. După aderență, invazia este produsă pe două căi: a) prin mecanismul ''fermoarului''; receptorii celulei gazdă semnalează aderența și induc modificările citoscheletului, în special ale filamentelor de actină, al căror rezultat este înglobarea bacteriei; de exemplu, intrarea *L. monocytogenes* în epiteliul intestinal este mediată de internalina bacteriană și de caderina E de pe suprafața celulelor epiteliale umane; b) înglobarea independentă de moleculele membranare ce mediază aderența. Interacția bacteriei cu membrana celulei gazdă produce intruzia localizată (*ruffling*), urmată de endocitoză. Pe această cale sunt endocitate nediscriminatoriu particulele aderente. Procesul a fost denumit macropinocitoză.

Fagocitele profesioniste exprimă receptori membranari pentru structurile conservate ale patogenilor microbieni, denumite *pathogen associated microbial pattern* (PAMP), care lipsesc de pe celulele mamaliene. Spectrul larg al agenților patogeni microbieni este recunoscut de un număr limitat de molecule receptoare ale gazdei (*pathogen recognition receptors* = PRR), care aparțin următoarelor grupe:

- *receptorii familiei TLR* (*Toll-like receptors*) recunosc structurile distincte ale microorganismelor: glicoproteine, lipoproteine, proteine de șoc termic, proteine flagelare;

- receptorii de tip *lectinic* cu specificitate pentru glucidele comune exprimate pe suprafața bacteriilor: a) receptorii pentru *manoză* (MBL) recunosc și alte glucide: N-acetilglucozamina, glucoza și L-fucoza; b) receptorii pentru *galactoză* recunosc N-acetilgalactozamina și galactoza; c) receptorii pentru *fucoză*;
- molecule membranare speciale: CD_{14}, cu specificitate pentru glicolipide (LPS) și pentru lipoarabinomananul (LAM) micobacteriilor.

Mecanisme de supraviețuire a bacteriilor patogene în celula gazdă

Majoritatea bacteriilor, inclusiv multe bacterii patogene, după ce sunt fagocitate de macrofage sau de neutrofile (PMNN) sunt omorâte. Unele bacterii patogene au elaborat strategii, care le permit să supraviețuiască și să se multiplice în interiorul fagocitelor. *Sh. flexneri, L. monocytogenes* și rickettsiile dizolvă vacuola inițială, de origine membranară și astfel dobândesc acces la citoplasma bogată în substanțe nutritive. *Salmonella sp., Mycobacterium sp.* și *Legionella* sp. evită sau inhibă fuziunea fagosomului cu lizosomii.

Majoritatea bacteriilor patogene internalizate sau fagocitate în vacuole ramân incluse în aceste structuri pe durata vieții intracelulare. Ele și-au elaborat strategii pentru anihilarea mecanismelor celulei gazdă destinate să omoare agentul invadant.

Factorii de virulență care determină rezistența la enzimele lizosomale și măresc capacitatea de supraviețuire intracelulară sunt:

- învelișul protector la suprafața celulei (capsula, LPS);
- enzimele bacteriene care neutralizează radicalii toxici ai O_2 și enzimele proteolitice care degradează enzimele lizosomale ale gazdei.

Motilitatea intracelulară dependentă de actină

Toate celulele pot forma diferite tipuri de pseudopode și intruzii ale membranei celulare, ca răspuns la stimulii externi: PMN, monocitele, macrofagele și celulele metastazante se deplasează ușor prin țesuturi. Mișcările lor sunt mediate de citoscheletul de actină.

Bacteriile patogene *L. monocytogenes, Shigella sp., Rickettsia* sp. posedă mecanisme prin care induc rearanjări ale citoscheletului celulei gazdă pentru a genera propria mobilitate. Aceste bacterii induc condensarea la una dintre extremitățile lor, a filamentelor scurte de actină celulară și a altor proteine ale citoscheletului. Se formează astfel o structură în creștere continuă, care propulsează celula bacteriană în citoplasma celulei gazdă și în celulele adiacente. Citoscheletul de actină este dinamic, unii monomeri se condensează, iar alții se disociază, furnizând forța motrice care permite celulei gazdă să adopte forme diferite și să asigure deplasarea orientată a celulei bacteriene.

Bacteriile intracelulare invadează celulele adiacente pe calea unor protruzii digitiforme proeminente la suprafața celulei infectate, care se formează când bacteria propulsată de apendicele de actină exercită o presiune pe fața internă a membranei citoplasmatice. În interiorul protruziei, polul bacterian opus direcției de deplasare este ocupat de "coada" de actină, de forma unui cilindru gol. Protruzia delimitată de membrană, care conține bacteria, cu o lungime de 20 μm, penetrează suprafața membranei în celula adiacentă și este înglobată prin fagocitoză. Ulterior, bacteria lizează membrana și se eliberează în citoplasma celulei adiacente. Cele mai multe protruzii conțin o celulă bacteriană în curs de diviziune sau chiar două bacterii (fig. 241).

Motilitatea mediată de actină este un factor esențial al virulenței pentru *L. monocytogenes* și *Shigella sp.*: deleția sau inactivarea genelor ce codifică proteinele care determină polimerizarea actinei atenuează virulența. După ce *L. monocytogenes* intră în celulă sau după plasarea în extractele citoplasmatice, asocierea cu actina are aspectul inițial al unui ''nor'' de actină filamentoasă care înconjoară bacteria. Norul evoluează într-o coadă de actină, care se extinde exclusiv de la un pol al bacteriei. Lungimea cozii este reglată de alte proteine: *cofilina* depolimerizează actina. Experiențele la voluntari umani și la maimuțe au arătat că mutantele de *Shigella* care nu asamblează apendicele de actină au o virulență mult mai atenuată, ceea ce evidențiază rolul motilității prin mecanismul condensării actinei pentru patogeneză. În celulele infectate, *Shigella* se deplasează cu rate de 5,4–26 μm/minut, asemănătoare cu rata deplasării *Listeria*. Apendicele format de *Shigella* este asemănător morfologic cu cel format de *Listeria*: are o lungime de 7μm și lățimea de 0,7 μm. Filamentele de

actină sunt uniforme (0,1 μm), reunite într-o rețea ramificată. Diferența față de *Listeria* constă în faptul că filamentele de actină sunt limitate la polul celulei și lipsesc pe laturile bacilului. Asamblarea cozii de actină este mediată de proteina IcsA (virG). Deleția genei codificatoare a proteinei IcsA duce la pierderea capacității de a asambla apendicele de actină. Proteina de 1102 aminoacizi (110 kDa), ancorată în membrana externă prin domeniul β-COOH terminal, este necesară și suficientă pentru asamblarea apendicelui de actină. Aproximativ 750 de aminoacizi ai domeniului α sunt expuși la suprafața celulei. După ce este inserată în membrana externă a polului celular vechi, proteina IcsA difuzează în zonele laterale ale bacilului. Domeniul α al proteinei IcsA, expus la suprafața celulei, conține toate regiunile necesare pentru asamblarea actinei. Proteina este localizată predominant la polul vechi al celulei. Când celula intră în diviziune, proteina IcsA începe să se exprime și pe celălalt pol. Apendicele de actină se asamblează pe polul celular la care IcsA are cea mai mare densitate.

Rickettsia sp. este un cocobacil Gram negativ, parazit obligat. Toți membrii grupului au capacitatea de a condensa apendicele de actină, prin intermediul căruia dobândesc mobilitate intracelulară. *Rickettsia* părăsește vacuola de endocitoză după circa 15 minute. În citoplasmă, în jurul celulei, se polimerizează un "nor" de actină, care se organizează într-un apendice la un pol al bacteriei. *Rickettsia* formează protruzii ale membranei celulei gazdă, prin intermediul cărora se disemineză în celulele proximale. Apendicele de actină este format din filamente mai lungi (0,3–3 μm), așezate paralel. În celulele mamaliene, *in vitro*, *Rickettsia* se deplasează cu rate de 4,8–8 μm/min, de două ori mai mică decât rata deplasării *Listeria* și *Shigella*. Spre deosebire de *Listeria* și *Shigella*, *Rickettsia* invadează nucleul și se multiplică. În nucleu, celulele bacteriene asamblează cozi de actină.

13.1. Chlamidii

Chlamidiile sunt bacterii Gram negative, parazite obligat cu localizare intracelulară, la o largă varietate de gazde. Speciile infecțioase pentru om sunt: *Chl. psittaci, Chl. trachomatis* (biovar lymphogranuloma venereum – LGV și trachoma) și *Chl. pneumoniae*. Diferențierea se face pe baza compoziției antigenice, a sensibilității la sulfonamide și a patogenezei. *Chl. pecorum* este infecțioasă pentru animale, dar nu pentru om.

Chlamidiile au morfologie asemănătoare și un ciclu comun de dezvoltare. Adaptându-se la existența intracelulară, chlamidiile au pierdut sistemul propriu producător de energie și nu produc ATP, dar au păstrat principalele activități metabolice: glicoliza, respirația, biosinteza pentozelor. Dezvoltarea intracelulară a chlamidiilor depinde de ATP și de alți compuși cu energie înaltă obținuți din celula gazdă. Chlamidiile au aparatul enzimatic necesar sintezei ADN, ARN și a proteinelor, dar preiau numeroși precursori din celula gazdă (nucleotide, aminoacizi, nutrienți, vitamine, diferiți cofactori) (Madigan și colab., 1997).

C. psittaci este parazită în special la păsări și mamifere neumane, dar pot fi infectate și vertebratele cu sânge rece, nevetebratele sau chiar omul.

C. trachomatis este parazită la șoarece și la om.

La mamifere și la păsări, ambele specii produc infecții ale conjunctivei oculare, tractului urogenital și respirator, ale tractului digestiv și probabil cu alte localizări (Barnes, 1990).

În ceea ce privește structura, s-au identificat 2 tipuri celulare chlamidiale:

- *corpul elementar*
- *corpul reticulat.*

Alternarea celor 2 tipuri celulare constituie ciclul de dezvoltare a chlamidiilor. Cele două forme distincte morfologic – corpul elementar și corpul reticulat – sunt adaptările la existența în mediul extracelular și respectiv, intracelular.

Particula infecțioasă stabilă în mediu este o celulă mică, denumită *corp elementar*, cu diametrul de 0,3 μm, cu o zonă centrală electronodensă, delimitat de peretele celular. Peretele celular al chlamidiilor se aseamănă cu peretele celular al bacteriilor Gram negative, cu conținut crescut de lipide, dar nu conține peptidoglican (fig. 314).

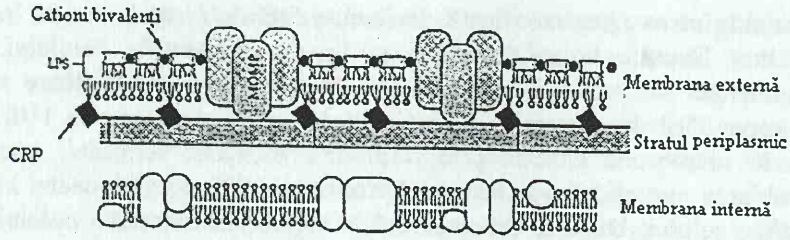


Fig. 314. Structura peretelui celular la *Chlamydia* (MOMP – proteina majoră a membranei extene; CRP – proteine bogate în cisteină) (Hatch, 1996).

Componentele analoge pentapeptidelor pot fi prezente, deoarece creşterea şi diviziunea lor este alterată în prezenţa antibioticelor β-lactamice.

Corpul reticulat conţine de 4 ori mai mult ARN decât ADN, iar în corpul elementar proporţia ARN/ADN este echilibrată. ADN este localizat în structura centrală electronodensă, iar ARN în ribosomi.

Chlamidiile au proprietăţi tinctoriale asemănătoare cu ale rickettsiilor: se colorează cu Giemsa, în contrast cu nuanţa albastră a citoplasmei celulei gazdă.

Ciclul de dezvoltare este bifazic, cu o formă extracelulară inactivă (latentă) şi o fază intracelulară care se multiplică. Stadiul de creştere şi multiplicare a chlamidiilor este obligat intracelular. Ele pătrund în celula gazdă, se multiplică şi se diseminează în mediul extracelular. Pentru a parcurge aceste etape, chlamidiile parcurg un ciclu de dezvoltare care cuprinde forme cu morfologie şi funcţii alternante.

Forma infecţioasă a chlamidiilor este *corpul elementar* (CE), ce se fixează pe membrana celulei ţintă şi iniţiază pătrunderea. Corpul elementar are dimensiuni mici, este dens, cu perete celular rigid, conferit de legăturile multiple S-S ale proteinei majore a membranei externe şi a altor 2 proteine bogate în cisteină: proteina de înveliş (60 kDa) şi o lipoproteină a membranei externe (12 kDa).

Corpul elementar este rezistent la factorii de mediu, favorizând supravieţuirea în mediul extracelular, după liza celulei gazdă şi trecerea de la o celulă la alta şi de la o gazdă la alta.

Corpul elementar nu se divide, este inert din punct de vedere metabolic, dar are afinitate înaltă pentru celulele epiteliale. Rolul său este de a propaga infecţia de la o celulă la alta. Membrana conţine heparan-sulfat (un proteoglican), cu funcţie de ligand, prin intermediul căruia corpul elementar se ataşează la baza microvililor şi este înglobat în vezicule tapetate cu clatrină, prin endocitoză mediată de receptori.

Intrarea în celulă este mediată de vezicula de fagocitoză derivată din membrana citoplasmatică a celulei gazdă. Chlamidiile rămân în vacuola neacidă în tot ciclul intracelular şi evită fuziunea cu lizosomii. Vacuola rămâne o structură distinctă faţă de căile de endocitoză şi exocitoză ale celulei, dar se pare că agentul infecţios exportă proteine care sunt încorporate în membrana vacuolei. În interiorul vacuolei mari, chlamidiile se redistribuie, de la periferia celulei spre zona perinucleară, printr-un mecanism dependent de actina F.

Fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoză este inhibată prin mecanisme necunoscute. În celulă, corpul elementar suferă schimbări morfologice şi se reorganizează în *corpul reticulat (CR)*, mai mare, activ metabolic, care se divide repetat prin fisiune binară, în endosomul care se extinde în citoplasmă şi devine vizibil ca o microcolonie, cunoscută ca *incluzie chlamidiană*. Corpii reticulaţi sunt structuri mai puţin rigide, care nu supravieţuiesc în mediul extracelular şi nu infectează celule noi.

Corpul elementar infecţios este convertit în corpul reticulat, prin alterarea structurii membranei externe datorită clivajului reducător al legăturilor S-S dintre proteina majoră a membranei externe şi alte proteine ale membranei externe. Reducerea legăturilor S-S duce la fluiditatea crescută a membranei, creşterea permeabilităţii, transportul nutrienţilor din celula gazdă şi reluarea activităţii metabolice. Absenţa legăturilor S-S din structura membranei explică fragilitatea osmotică şi mecanică a corpului reticulat chlamidial.

După o perioadă de creştere şi diviziune, corpul reticulat se reorganizează, se condensează şi formează numeroşi corpi elementari, infecţioşi. Ciclul de dezvoltare este complet, odată cu liza celulei gazdă sau când corpii elementari sunt exocitaţi şi iniţiază un nou ciclul infecţios (fig. 315).

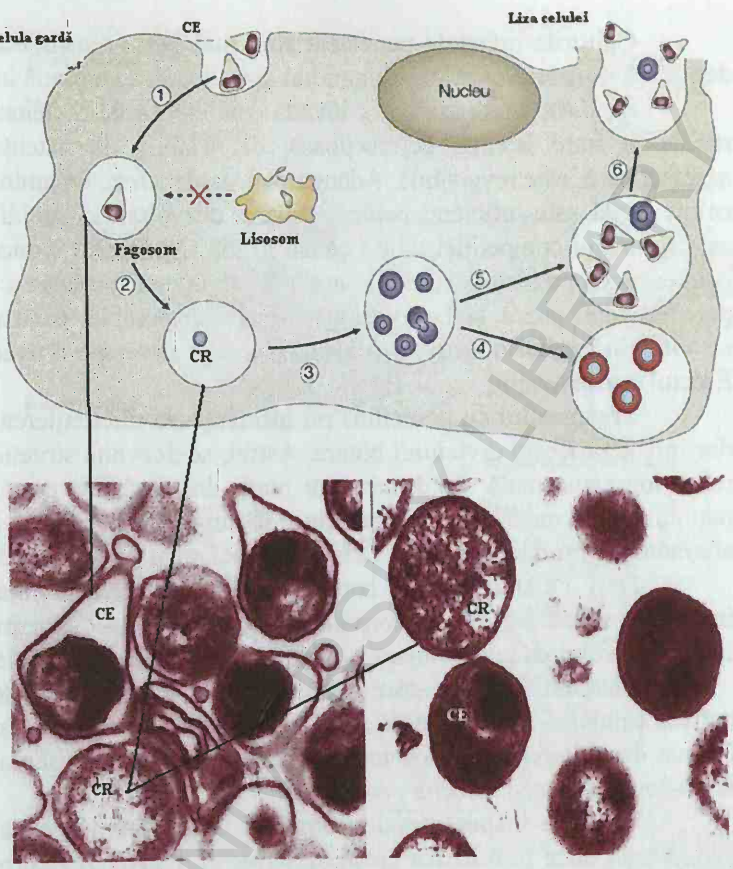


Fig. 315. Ciclul de viaţă la *Chl. pneumoniae* (Campbell şi Kuo, 2004).

Durata ciclului complet de dezvoltare, studiat în culturi celulare, este de 47–72 de ore şi variază în funcţie de tulpină, de celula gazdă şi de condiţiile de mediu.

Intrarea *Chl. psittaci* şi *Chl. trachomatis* în fagocitele profesioniste şi neprofesioniste se face prin acelaşi mecanism şi este independentă de energie. Incluziile intracelulare asociate multiplicării *Chl. trachomatis* conţin glicogen, spre deosebire de cele produse de *Chl. psittaci*.

Patologie. Chl. trachomatis biovar *trachoma* infectează exclusiv celulele epiteliale squamoase columnare ale conjunctivei, tractului genital şi respirator, constituind cauza majoră a infecţiilor cu transmitere sexuală pe tot globul şi a orbirii infecţioase (trachoma) în ţările nedezvoltate.

Chlamidiile pot produce infecţii ale tractului respirator şi sunt asociate cu ateroscleroza.

Trachoma este o maladie oculară, o keratoconjunctivită cronică, ce debutează cu inflamaţia acută a conjunctivei şi corneii şi progresează la desprinderea corneei şi orbire. În ariile endemice, infecţia are loc în copilărie, iar consecinţa pe termen lung – trachoma – se instalează lent. La bărbaţi, *Chl. trachomatis* produce uretrită negonococică.

Procesul patologic datorat infecţiei chlamidiale pare a fi mediat de *reactivitatea imunitară*. Răspunsul imun al gazdei stimulat de episoadele repetate ale infecţiei amplifică leziunile patologice. Reinfecţia sau persistenţa în stare inaparentă a unei forme modificate a chlamidiei determină modificările patologice.

Persistenţa infecţiei chlamidiene s-a evidenţiat în diferite culturi celulare, fiind asociată cu modificarea modului de dezvoltare a chlamidiilor, care rămân viabile, dar se opresc temporar într-un stadiu neproductiv al ciclului de creştere, ceea ce sugerează capacitatea înnăscută a chlamidiilor de a persista intracelular, fapt care ar reprezenta modalitatea de inducere a procesului patologic. Factorii care favorizează persistenţa sunt necunoscuţi.

Chlamidiile, ca şi ceilalţi patogeni intracelulari, eludează mecanismele de apărare ale celulei gazdă. Chlamidiile endocitate sunt sechestrate în fagosomul derivat din membrana celulei gazdă. Evenimentul esenţial care permite supravieţuirea agentului infecţios în celula gazdă este inhibiţia fuziunii fagosomului cu lizosomii.

Culturile infectate persistent sunt mai puțin sensibile la rifampină și clortetraciclină, ceea ce denotă că transcrierea ADN chlamidial și traducerea continuă în formele persistente.

In vitro, chlamidiile pot invada celulele gazdă deficiente în substanțe nutritive și după intrare rămân în stare latentă, neinfecțioasă, dar viabilă. Persistența chlamidiilor în formă nereplicativă, neinfecțioasă, este reversibilă. Adăugarea L-izoleucinei, un aminoacid esențial pentru chlamidii și pentru celula gazdă, este suficientă pentru activarea dezvoltării chlamidiilor. Se crede că persistența chlamidiilor este rezultatul competiției dintre celula gazdă și parazitul intracelular pentru L-izoleucină. Tratamentul celulei gazdă cu cicloheximidă – inhibitor al sintezei proteice a celulei gazdă – stopează competiția din partea celulei gazdă și L-izoleucina rămâne disponibilă pentru sinteza proteică chlamidială. Absența *cisteinei* în mediul nutritiv al celulelor *in vitro* întrerupe diferențierea corp reticulat – corp elementar. Efectul este reversibil.

Tratamentul cu penicilină nu influențează diferențierea corpilor elementari în corpi reticulați, dar inhibă procesul diviziunii binare. Astfel, se dezvoltă structuri chlamidiale ale corpilor reticulați cu morfologie anormală, de dimensiuni mari, dar formarea corpilor elementari este blocată. Scoaterea penicilinei din mediul de cultivare duce la înmugurirea extensivă și subdiviziunea internă a structurilor aberante, cu formarea corpilor reticulari tipici, care se maturează în corpi elementari infecțioși.

Deși chlamidiile nu conțin peptidoglican, penicilina, ampicilina și cicloserina au efect inhibitor asupra dezvoltării corpului reticulat în corpi elementari. Cloramfenicolul și clortetraciclina inhibă dezvoltarea intracelulară a chlamidiilor, ca și antibioticele ce inhibă sinteza acizilor nucleici.

Chlamidiile induc sinteza interferonilor, cu efect inhibitor asupra creșterii agentului patogen în culturi celulare. Nivelul înalt al IFNγ limitează complet creșterea chlamidiilor, iar nivelul scăzut induce dezvoltarea formelor intracelulare cu morfologie aberantă. Interferonii favorizează creșterea formelor aberante și infecția persistentă.

Infecțiile inaparente ale trompelor determină infertilitatea. Eliminarea factorilor inductori ai persistenței duce la reluarea creșterii active și dezvoltarea corpilor elementari infecțioși. Reactivarea infecției chlamidiale *in vivo*, se produce în condiții de imunosupresie, ceea ce implică rolul răspunsului imun în infecția persistentă.

Chlamidiile se izolează mai frecvent de la femeile cu infecție gonoreică.

Chlamidiile infectează celulele epiteliale ale mucoaselor, dar este puțin probabil ca acesta să fie situsul infecției persistente, datorită turnoverului natural al acestor celule. Turnoverul natural și liza celulelor exfoliate duce la eliberarea antigenelor chlamidiale și la stimularea răspunsului imun, dar și la pierderea celulelor infectate persistent.

Se pare că *Chl. trachomatis* realizează infecții persistente în țesutul subepitelial.

Chl. pneumoniae produce infecții acute ale tractului respirator (faringite, bronșite, pneumonii) sau complicații tardive (astm, rinită alergică, afecțiuni cardiace, scleroză multiplă, boala Alzheimer) (Friedman și colab., 2004). Există foarte multe studii care demonstrează rolul infecției chlamidiene în ateroscleroză. Corpii elementari (CE) de *Chl. pneumoniae* sunt endocitați de macrofagele alveolare, unde se diferențiază în corp reticulat (CR), ce se multiplică și formează o incluzie matură. Monocitele circulante sunt infectate, iar apariția incluziilor modulează aderența acestora la endoteliul vascular. Macrofagele aderate migrează ulterior în intima veselor de sânge, unde vor determina infecția altor tipuri celulare, inclusiv a macrofagelor arteriale, care vor prelua LDL și vor deveni astfel macrofage cu aspect "spumos", datorită colesterolului depozitat. Fibrele musculare netede vor fi de asemenea infectate de către CE și proliferează, iar celulele endoteliale infectate secretă o serie de citokine, care în final vor duce la destabilizarea plăcii de aterom și la formarea trombilor, cu creșterea riscului de infarct miocardic (fig. 316).

Diagnosticul direct presupune cultivarea chlamidiilor pe culturi de celule (McCoy – fibroblaste de șoarece, HeLa 229 – carcinom de col uterin uman, BHK-1-fibroblaste de hamster), evidențierea incluziilor chlamidiale direct în produsul patologic (pe frotiuri colorate Giemsa metoda modificată, cu iod, sau prin imunofluorescență cu anticorpi monoclonali) decelarea antigenelor chlamidiale în produsele patologice (ELISA, imunofluorescență directă, imunoblot) sau detectarea acizilor nucleici (hibridizare, PCR). Diagnosticul serologic se bazează pe evidențierea anticorpilor specifici de tip IgM (marker de infecție acută), IgG și IgA (marker de reacutizare a infecției).

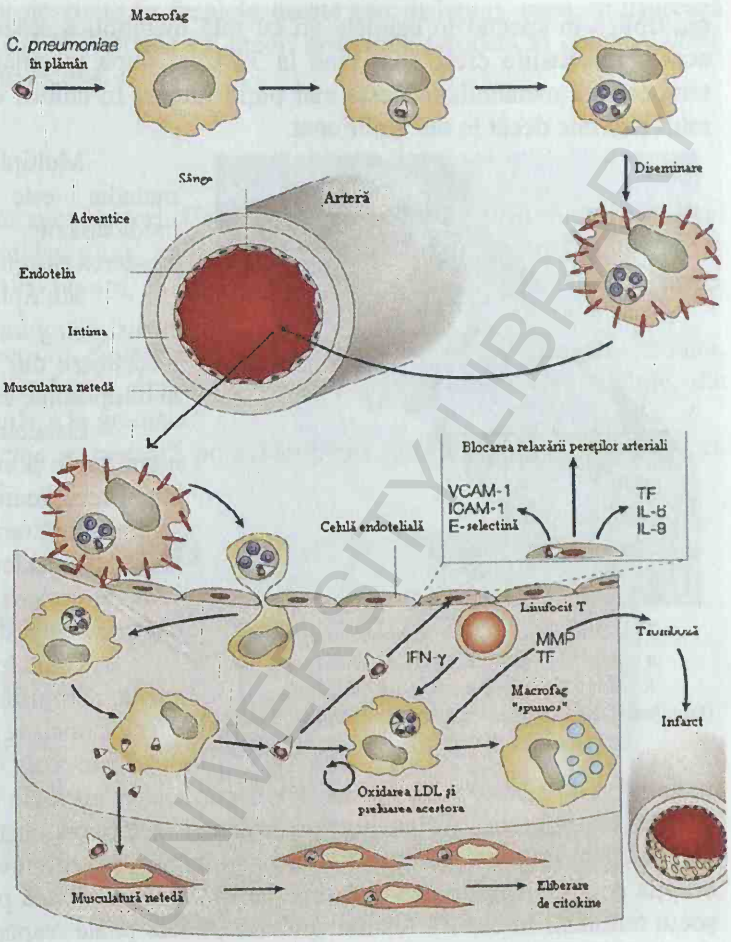


Fig. 316. Mecanismele posibile prin care *Chl. pneumoniae* poate favoriza ateroscleroza (TF – *tissue factor*) (Campbell şi Kuo, 2004).

13.2. Rickettsii

Rickettsiile sunt bacterii parazite obligat intracelulare, Gram negative, aerobe, de dimensiuni mici, pleomorfe: coci 0,3–0,4 μm izolați sau perechi, cocobacili (0,3 x 1–2 μ), bacili (3–4 μm) şi mai rar de forma unor filamente subțiri (10–20 μm).

Fig. 317. R. rickettsii pe frotiu din hemolimfă de căpuşă, colorat după metoda Gimenez (http://www.textbookofbacteriology.net/Rickettsia_2.html).

Rickettsiile au afinitate scăzută pentru coloranți. Nu se colorează Gram, dar se colorează după contactul prelungit cu colorantul, prin metoda Gracian (foloseşte colorant Giemsa) sau prin metoda Gimenez (cu fuxină bazică 0,4% şi verde malachit) (fig. 317).

Rickettsiile supraviețuiesc un timp foarte scurt în mediul extracelular, cu excepția *Rochalimaea quintana* (agentul etiologic al febrei de tranşee), care creşte pe mediu inert.

Rickettsiile au multe dintre capacitățile metabolice ale bacteriilor, dar pentru exprimarea lor necesită cofactori ai celulei gazdă. Membrana citoplasmatică a rickettsiilor izolate este foarte permeabilă, ceea ce explică dependența lor de mediul intracelular al gazdei. Respirația pare a fi *aerobă*, deoarece în oul embrionat se multiplică mai bine în zonele bine aprovizionate cu O_2.

Rickettsiile se dezvoltă numai în celulele anumitor țesuturi ale speciilor sensibile (fig. 318). Se

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

multiplică în special în celulele vii cu rată metabolică scăzută, care au încetat să se multiplice. De aceea, rickettsiile cresc mai bine la 32°C şi după inoculare în sacul scrotal, deoarece la această temperatură metabolismul este mai puţin intens. În culturi de celule, randamentul multiplicării este mult mai mic decât în oul embrionat.

Fig. 318. Evidenţierea imunohistologică a infecţiei endoteliului vascular cu *R. rickettsii* la un pacient cu febră pătată (http://www.textbookofbacteriology.net/Rickettsia_6.html).

Multiplicarea este stimulată de sulfonamide, iar maladia este mai severă în prezenţa acestor medicamente. Tetraciclina şi cloramfenicolul inhibă creşterea rickettsiilor şi pot fi eficiente terapeutic.

Multiplicarea rickettsiilor este, în cele mai multe cazuri, *citoplasmatică*, dar cele care produc procese infecţioase din grupul febrelor pătate se multiplică atât în citoplasma, cât şi în *nucleul* celulei gazdă.

Gazdele naturale ale rickettsiilor sunt mamiferele şi artropodele. Artropodele sunt atât vectori, cât şi rezervoare naturale de rickettsii, la care bacteriile se transmit transovarian. *Rickettsia prowazeki*, agentul tifosului exantematic, este prezentă în conţinutul şi în celulele epiteliale ale tubului digestiv al păduchelui de cap şi de corp, de unde este transmisă la om.

Celulele rickettsiene aderă la suprafaţa celulei gazdă. Tropismul lor pentru *celulele endoteliale* ale vaselor mici de sânge este bine exprimat. Multiplicarea în aceste vase produce vasculita. Celulele îşi măresc volumul şi se necrozează. Modificarea funcţională imediată este creşterea permeabilităţii vasculare, urmată de un proces inflamator cu formarea trombilor, obstrucţia circulaţiei sângelui, transvazarea eritrocitelor. Angeita vaselor mici din tegument, creier, miocard este suportul manifestărilor clinice: erupţia peteşială tegumentară (începe pe trunchi şi continuă pe membre), starea de confuzie mentală, şocul terminal. În cazul tifosului epidemic, boala poate reapărea după ani de zile de la prima infecţie (boala Brill-Zinsser).

Din punct de vedere clinic, rickettsiile aparţin următoarelor 3 grupuri: grupul rickettsiilor tifos epidemic, endemic şi grupul febrei pătate (tabelul 29).

Tabelul 29.

Clasificarea rickettsiilor în funcţie de caracteristicile epidemiologice şi clinice ale infecţiei

Specia	*R. prowazekii*	*R. typhi*	**R.rickettssii*
Boala	Tifos epidemic	Tifos endemic	Febra pătată a Munţilor Stâncoşi
Rezervor	Uman	Rozătoare	Rozătoare, câini, căpuşe
Vector	Păduchi	Purici	Căpuşe
Calea de eliminare din vector	Fecale	Fecale	Muşcătură

* Pe lângă *R. rickettssii*, grupul febrei pătate mai cuprinde o serie de alte specii care produc rickettsioze umane: *R. conorii, R. mongolotimonae* şi *R. slovaca* (febra butunoasă), *R. akari* (varicela rickettsiană), *R. japonica* (febra pătată japoneză), *R. sibirica* (tifosul căpuşei din Asia de Nord), *R. africae* (febra muşcăturii de căpuşă africană), *R. helvetica* (perimiocardită), *R. australis* (tifosul căpuşei de Queensland) şi *R. honei* (febra pătată din insulele Flinders) (Todar, 2009).

La om, infecţia este urmată de imunitate parţială la reinfecţia din surse externe. Diagnosticul de laborator completează diagnosticul clinic şi se bazează pe evidenţierea antigenelor prin teste ELISA, a anticorpilor prin imunofluorescenţă indirectă sau a ADN prin teste PCR. Tratamentul de elecţie este doxiciclina.

13.3. *Coxiella burnetii* (ordinul *Legionellales*, familia *Coxiellaceae*) (agentul febrei Q)

(Q – *query fever* sau *Queensland fever*) este un cocobacil Gram negativ, intracelular, care se aseamănă foarte mult cu rickettsiile, însă diferenţele genetice şi fiziologice au motivat separarea acestora într-un gen aparte. Spre deosebire de ricketsii, *Coxiella* este rezistentă la căldură (60°C timp de 30 min),

uscăciune şi lumină solară (trăieşte luni de zilele în fecalele uscate sau în lapte), ceea ce uşurează transmiterea de la o gazdă la alta şi poate fi cultivată pe medii artificiale (Anders şi colab., 2009). *Coxiella* este sensibilă la doxicilină şi tetraciclină.

13.4. Genul Ehrlichia

Reprezentanţii genului *Ehrlichia* sunt bacterii Gram negative mici (0,5 μm), paraziţi obligat intracelulari. Infectează leucocitele circulante, se multiplică în vacuolele fagocitare şi formează aglomerări cu aspect de morulă (fig. 319). La om, *E. chaffensis* produce infecţia monocitelor, iar *E. ewingii* infectează granulocitele.

Ehrlichia se aseamănă cu *Chlamydia*, deoarece ambele se multipică în vacuole intracelulare. Infecţiile produse de *Ehrlichia* se manifestă prin simptome nespecifice: febră, frisoane, mialgie, rău general, senzaţia de vomă, anorexie, pierdere în greutate.

Diagnosticul infecţiei cu *Ehrlichia* se bazează pe evidenţierea microscopică a incluziilor cu aspect de morulă în leucocitele infectate.

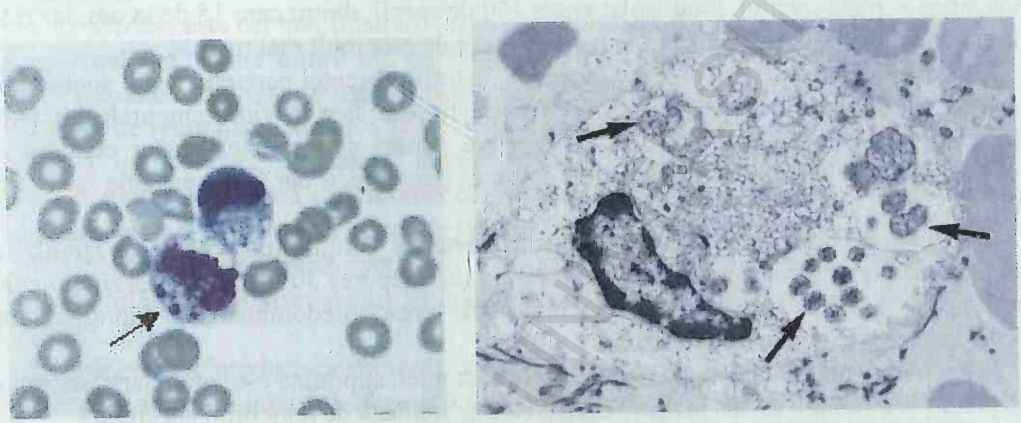


Fig. 319. Monocit circulant infectat, cu aspect de morulă (stânga). Imagine electrono-optică a unei incluzii cu aspect de morulă într-un leucocit din măduva osoasă la un pacient cu ehrlichioză (dreapta) (http://www.cvbd.org/4029.0.html).

Pentru confirmare se foloseşte metoda fluorescenţei indirecte. *Ehrlichia* este sensibilă la doxiciclină şi rifampicină.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14. MICOPLASME

Micoplasmele sunt cele mai mici organisme care trăiesc liber în mediile naturale, cu capacitatea de multiplicare pe substratul nutritiv inert. Se deosebesc de alte bacterii, atât prin dimensiunile mici (125–250 nm), cât şi prin absenţa peretelui celular. Trec prin filtrele cu pori de 450 nm, fiind asemănătoare, din acest punct de vedere, cu chlamidiile şi cu virusurile mari. Absenţa peretelui constituie un criteriu taxonomic: micoplasmele sunt grupate într-o clasă separată – *Mollicutes* (în limba latină = piele moale). S-au izolat peste 150 de specii, dintre care 15 de la om, iar restul de la animale şi plante, dar numărul acestora în mediile naturale este mult mai mare.

Micoplasmele sunt celule foarte *pleomorfe*, datorită absenţei peretelui rigid: sunt delimitate de o membrană trilaminară, ce conţine steroli. Nu sintetizează steroli, fiind singurele procariote care necesită adăugarea *sterolului* în mediul de creştere pentru sinteza membranei celulare. Datorită absenţei peretelui mureinic, sunt rezistente la acţiunea penicilinei, dar sunt sensibile la tetraciclină şi eritromicină.

Cultivare. Micoplasmele cresc pe medii inerte ce conţin lipoproteine şi steroli: *bulionul peptonat* suplimentat cu lichid ascitic sau ser animal (cal, iepure) 30%. După 2–3 zile, mediul lichid rămâne limpede sau se tulbură uşor. Micoplasmele cresc predominant la suprafaţa culturii şi morfologia celulelor este foarte heterogenă.

Pe mediul solidificat cu agar 2%, coloniile sunt mici, suprafaţa este granulară, centrul coloniei este sub nivelul suprafeţei, inclus în agar. Creşterea este inhibată de anticorpii specifici.

Din multitudinea micoplasmelor care trăiesc pe materia organică în mediile naturale, foarte puţine au fost cultivate. Dintre cele cultivate, unele cresc foarte lent pe mediile nutritive disponibile. Micoplasmele au numeroase deficienţe de sinteză a unor molecule şi de aceea necesită pentru cultivare medii complexe, care se bazează pe infuzia de inimă de bovine, peptonă, extract de levuri şi ser cu diferite suplimente. Nu s-au cultivat în cultură pură (axenică) micoplasmele infecţioase pentru insecte şi plante.

Multe micoplasme metabolizează glucoza, produc peroxizi şi lizează hematiile. Sursa de azot este amoniul. Pentru *Ureaplasma,* sursa de azot este ureea. Micoplasmele sunt organisme *saprobionte* pe materia organică în mediile naturale sau sunt parazite cu o distribuţie largă la om, mamifere, reptile, peşti, artropode, plante. Speciile descrise formează o proporţie minoră dintre cele existente în natură. De cele mai multe ori, infecţiile cu micoplasme sunt uşoare şi comune. Rareori, infecţia are efect letal pentru gazdă. Relaţia micoplasmelor cu gazdele pare să evolueze spre simbioză, deoarece spiroplasmele şi fitoplasmele au efecte patogene minime, iar efectele defavorabile asupra insectelor vectoare lipsesc.

Micoplasmele au afinitate pentru membrana citoplasmatică. Habitatul primar al micoplasmelor umane şi animale este suprafaţa mucoaselor tractului respirator, urogenital, digestiv, conjunctiva oculară, glandele mamare şi articulaţiile. Micoplasmele obligat anaerobe s-au găsit numai în rumenul bovinelor şi ovinelor.

Micoplasmele sunt componente ale *microbiotei normale* a cavităţii orale şi se izolează din salivă, de pe epiteliul mucoasei bucale, tonsile, din mucoasa tractului genital, urinar şi respirator. Unele micoplasme fac parte din microbiota normală a tractului genital şi urinar, în special feminin. Diversitatea micoplasmelor genitale este proporţională cu numărul partenerilor sexuali.

Din punct de vedere evolutiv, micoplasmele reprezintă un nivel minim al organizării celulare, un minimum vital. *M. genitalium* este organismul cu cel mai mic genom (de două ori mai mare decât al virusurilor pox), fiind cea mai apropiată de celula teoretică minimală, capabilă de autoreproducere.

De la om s-au izolat *M. hominis, M. salivarium, M. orale, M. fermentans, M. pneumoniae, M. genitalium, M. urealiticum* etc. Atribuirea izolatelor la diferitele specii se face pe baze biochimice şi serologice: specificitatea antigenică a glicolipidelor membranare se identifică cu seruri imune în reacţia de fixare a complementului, iar a proteinelor, prin testele ELISA.

Micoplasmele manifestă, în general, specificitate de organ şi de ţesut: *M. pneumoniae* populează preferenţial tractul respirator, dar s-a izolat din tractul genital, iar *M. genitalium* s-a găsit în primul rând în tractul urogenital, dar şi în tractul respirator.

Micoplasmele infectează persistent culturile de celule animale. Se apreciază că între 10–87% din totalul culturilor celulare sunt infectate cu micoplasme. Culturile celulare reprezintă un habitat artificial nenatural.

În ţesuturile insectelor, micoplasmele sunt paraziţi intracelulari. La mamifere, inclusiv la om, micoplasmele aderă la suprafaţa celulelor ciliate şi neciliate, probabil la resturile de acid sialic şi la glicolipidele sulfatate, sunt înglobate de PMN şi de macrofage, dar probabil că nu pătrund în celulele epiteliale.

Mecanismul pătrunderii micoplasmelor în celulele gazdei nu este clar: unele aderă de celulele gazdă prin structuri moleculare polare specializate şi apoi sunt internalizate, dar altele sunt lipsite de astfel de structuri.

M. penetrans este cel mai ilustrativ exemplu de micoplasme care pătrund activ într-o varietate de celule mamaliene, multe dintre ele cu capacitate fagocitară minimă. Internalizarea patogenului într-o celulă gazdă este iniţiată de legarea patogenului de celulă. Aderenţa declanşează eliberarea unui semnal, urmată de rearanjarea amplă a proteinelor microtubulilor şi a microfilamentelor. Se consideră că localizarea intracelulară protejează micoplasmele faţă de acţiunea efectorilor imunitari şi a antibioticelor. Astfel se explică dificultatea eradicării micoplasmelor din culturile celulare infectate. Rezidenţa intracelulară favorizează infecţiile cronice latente (Razin, 1998).

Micoplasmele par să aibă specificitate de gazdă. La om şi animale, micoplasmele par a fi paraziţi intracelulari, cu tropism pentru celulele mezoteliale (pleură, peritoneu, membrana sinovială a articulaţiilor).

M. pneumoniae produce pneumonia în special la copii şi la tinerii până la vârsta de 20 de ani. Se transmite prin aerosolii infectaţi. Perioada de incubaţie este de 1-3 săptămâni. Infecţia variază de la cea asimptomatică, până la pneumonie severă. Micoplasmele induc sinteza hemaglutininelor la rece pentru eritrocitele de grup 0, la 50% dintre pacienţi, al căror titru este mai mare de 1:64, la 3–4 săptămâni după infecţie.

Ureaplasma urealyticum şi *M. hominis* sunt patogeni ai tractului genital, fiind agenţi etiologici ai uretritei negonococice, bolii inflamatorii pelvice, cervicale, orhitei, epididimitei, care secundar pot duce la sterilitate. Administrarea nejudicioasă a antibioticelor a condus la apariţia rezistenţei la antibiotice, antibiograma fiind absolut necesară.

La animale, micoplasmele produc *pleuropneumonia*, o boală contagioasă, uneori letală a bovinelor. Infecţia este transmisă pe cale aeriană.

Agalactia oilor şi *caprinelor* este o infecţie generalizată, cu leziuni locale în tegument, ochi, articulaţii, uger, scrot. La femele infecţia produce atrofia glandelor mamare.

Porcul, câinele, rozătoarele poartă micoplasme care produc infecţii pleurale, peritoneale, articulare, respiratorii.

Micoplasmele infecţioase pentru păsări sunt transmise pe verticală, prin ou.

Factorii de patogenitate ai micoplasmelor parazite sunt reprezentaţi, în primul rând, de *adezine*. Adezinele sunt proteine membranare care mediază aderenţa la celula gazdă, bine exprimate la *M. pneumoniae* şi *M. genitalium,* sub forma structurilor polare specializate.

După aderenţă, micoplasmele pot să producă fenomene de *citotoxicitate directă* prin stresul oxidativ (radicalul superoxid şi H_2O_2) pe care-l generează şi prin *competiţia pentru nutrienţi.*

Micoplasmele exprimă un pleomorfism extrem şi o *variaţie antigenică* accentuată, consecinţă a plasticităţii fenotipice*.

* Teoria plasticităţii fenotipice consideră că bacteriile răspund modificărilor mediului de viaţă, prin schimbări structurale şi funcţionale (metabolice) profunde, în cadrul aceleiaşi norme genetice.

De cele mai multe ori, la organismele patogene, consecința majoră a plasticității fenotipice este variația antigenică. Termenul de "variație antigenică" sau "comutare fenotipică" înseamnă capacitatea unei specii microbiene de a-şi modifica specificitatea antigenică a componentelor de suprafață (flageli, fimbrii, proteine ale membranei externe, polizaharidul capsular), mărindu-şi capacitatea de colonizare a țesuturilor gazdei şi de evitare a factorilor imunitari. Structurile suprafeței celulare sunt țintele majore ale răspunsului imun humoral.

Generarea unui înveliş antigenic versatil cu o rată înaltă a modificărilor, oferă organismului infecțios modalitatea de a evita efectul neutralizant al anticorpilor.

Unele micoplasme produc *hemolizine*.

Răspunsul imun anti-micoplasme este o modalitate de protecție a organismului dar este implicat în dezvoltarea leziunilor patologice şi în exacerbarea maladiei indusă de micoplasme.

Micoplasmele au efect imunomodulator accentuat, deoarece influențează reactivitatea sistemului imunitar al gazdei: pot induce imunosupresia, stimularea policlonală a limfocitelor T şi B, inducția sintezei citokinelor, stimularea efectului citotoxic al macrofagelor, al celulelor NK şi al celulelor Tc; stimulează expresia receptorilor celulari şi activarea cascadei complementului. Capacitatea imunomodulatoare a micoplasmelor contribuie direct la manifestarea proprietăților de virulență: ele pot evita sau suprima mecanismele de apărare ale gazdei, stabilind astfel o infecție cronică persistentă.

Efectul *imunosupresor* este consecința epuizării de către micoplasme a *argininei,* un aminoacid esențial, pe calea arginin-dihidrolazei.

Micoplasmele şi componentele celulare derivate din micoplasme modulează activitatea macrofagelor, celulelor NK şi răspunsul imun prin intermediul *chemokinelor* şi *citokinelor* stimulatoare şi inhibitoare.

Micoplasmele stimulează sinteza şi secreția *citokinelor proinflamatorii* (TNF-α, IL-1 şi IL-6 produse de macrofage), cu rol major în modularea răspunsului inflamator şi imun.

Citokinele IL-10, IL-13 şi TGF-β favorizează evaziunea micoplasmelor în raport cu factorii protectori ai gazdei, deoarece inhibă funcția fagocitelor, inhibă sinteza citokinelor proinflamatorii şi proliferarea limfocitelor T.

IL-10 este o citokină inhibitorie a răspunsului imun, sintetizată în special de limfocitele Th-2 şi de macrofage şi într-o măsură mai mică de alte celule imunitare. IL-10 inhibă activitatea celulelor prezentatoare de antigen (CPA), inhibă sinteza citokinelor proinflamatorii (IL-1, TNF-α, IFN-γ), stimulează diferențierea limfocitelor B în celule producătoare de IgG_4 (anticorpi citofili).

Multe micoplasme stimulează celulele seriei monocit-macrofag să secrete citokine proinflamatorii, care produc răspuns inflamator local şi sistemic.

TNF-α (produs în special de fagocitele mononucleare, de celulele Th, NK şi de alte celule neimunitare) este mediatorul principal al reacției inflamatorii, al caşexiei, al stării febrile, al eliberării PFA (factorul de agregare plachetară), al şocului septic şi necrozei hemoragice a țesutului tumoral.

Infecția cu micoplasme poate produce maladia articulară acută şi cronică, asemănătoare cu artropatiile inflamatorii, inclusiv cu artrita reumatismală.

Probele se inoculează pe mediu solidificat sau bulion special incubat timp de 3–10 zile, în atmosferă cu 5% CO_2, în condiții microaerofile. Mediul se examinează pentru apariția coloniilor cu aspect de "ou ochi". La ora actuală cultivarea se face pe galerii cu medii microtest care permit şi stabilirea spectrului de sensibilitate la un număr de până la 12 antibiotice (fig. 320).

După infecție se sintetizează anticorpi, care se evidențiază în *reacția de fixare a complementului*, cu antigene glicolipidice extrase cu cloroform-metanol din micoplasmele cultivate.

Testul de *hemaglutinoinhibare* se realizează cu hematii tanate pe care s-au adsorbit antigene de *Mycoplasma*.

Diagnosticul *molecular* al micoplasmelor prin PCR a constituit un test sensibil pentru prezența ADN genomic în lichidul sinovial al pacienților cu artrită reumatoidă. Rezultatele analizei privind prezența ADN de micoplasme în lichidul sinovial al pacienților sunt neconcludente.

Fig. 320. Exemplu de kituri utilizate în prezent pentru diagnosticul infecției cu *Mycoplasma.* În imaginea din dreapta sus, aspectul caracteristic, de "ou ochi" al coloniilor de *Mycoplasma* dezvoltate pe mediu solid, repartizat în plăci (http://www.wescor.com/biomedical/im/mycoscreen.html, http://www.tradeindia.com/fp616895/Mycoplasma-Identification-Enumeration-Susceptibility-Kit.html).

Bibliografie selectivă

1. Anders O., Cockrell, D. C., Howe D., Fischer, E. R., Virtaneva K., Sturdevant D. E., Porcella H., Robert A. 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*, PNAS. 106 (11): 4430–4434
2. Barnes R. C. 1990. Infections Caused by *Chlamydia trachomatis* Chapter 6 in Morse, et al, *Sexually Transmitted Diseases*. J.B. Lippincott. Philadelphia
3. Campbell L. A., Kuo C.C. 2004. *Chlamydia pneumoniae* — an infectious risk factor for atherosclerosis? Nature Reviews Microbiology :3–32
4. Hatch T. P. 1996. Disulfide Cross-Linked Envelope Proteins: the Functional Equivalent of Peptidoglycan in Chlamydia? Journal of Bacteriology. 178: 1–5.
5. http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chalmydias/spirochaetes.html
6. http://www.tradeindia.com/fp616895/Mycoplasma-Identification-Enumeration-Susceptibility-Kit.html
7. http://www.wescor.com/biomedical/im/mycoscreen.html
8. Madigan M. Martinko J., Parker J. 1997. Brock's Biology of Microorganisms. eighth edition. New Jersey: Prentice Hall.
9. *Ouelette S. P., Byrne G. I. 2004.* Chlamydia pneumoniae*: Infection and disease. In Friedman H., Yamamoto Y, Bendinelli M. ed. Infectious agents and pathogenesis. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*
10. Todar K. 2009. Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology. http://www.textbookofbacteriology.net/Rickettsia.html

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR MICROBIENE

Bolile transmisibile se află şi în prezent în topul cauzelor de mortalitate şi morbiditate la nivel mondial şi utilizează o proporţie nejustificat de mare din bugetul alocat sănătăţii în ţările în curs de dezvoltare. Conform Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii (OMS), diareea acută este cauza a 2.2 milioane decese anual. Infecţiile acute respiratorii (în principal, pneumonia) reprezintă o altă cauză importantă a mortalităţii, estimată la 4 milioane decese anual (WHO, 2003). Numărul cazurilor de pneumonie bacteriană cu *H. influenzae* şi *Str. pneumoniae* şi al tulpinilor rezistente la benzilpeniciline ca şi al bolilor cu transmitere sexuală de origine virală sau bacteriană este în permanentă creştere (WHO, 2003).

Pentru prevenirea şi controlul eficient al principalelor infecţii bacteriene este necesară dezvoltarea unor modalităţi de supraveghere epidemiologică şi monitorizare a maladiilor infecţioase, precum şi existenţa unor tehnici de diagnostic sensibile, specifice şi simple.

15.1. Noţiuni de asigurarea calităţii în bacteriologia clinică

Nomenclatură, definiţii

Asigurarea calităţii (AC) reprezintă ansamblul de acţiuni prestabilite şi sistematice necesare pentru ca un produs sau un serviciu prestat să satisfacă exigenţele calităţii, o iniţiativă care tinde spre "0 erori" şi previne eroarea în loc să o constate *a posteriori* (ISO 8402/1995). AC este procesul complet prin care calitatea raportărilor laboratorului poate fi garantată. Pentru laboratorul de microbiologie, AC înseamnă asigurarea obţinerii unui rezultat corect, în timpul optim, din proba adecvată, recoltată corespunzător, de la pacientul potrivit, cu interpretarea rezultatelor pe baza datelor de referinţă corecte, la cel mai bun preţ.

Calitatea reprezintă aptitudinea unui produs, procedură sau serviciu de a satisface **cerinţele cunoscute** şi **potenţiale** ale utilizatorului (medicul de familie, medicul specialist, pacientul), la nivel tehnic, economic (performanţe maxime la costuri competitive), ecologic (are în vedere protecţia personalului şi a mediului) şi informativ (un rezultat trebuie uneori însoţit de un comentariu şi de asemenea, de explicarea necesităţii întârzierii răspunsului, atunci când este cazul) (ISO 8402/1995).

Cerinţele sau **necesităţile cunoscute** se referă la analize uzuale ale produselor biologice clasice (sânge, urină etc.), care dacă sunt realizate corect facilitează precizarea diagnosticului, iar cele **potenţiale** se referă la analize noi, realizate prin tehnici moderne din alte produse decât cele clasice (de exemplu, firul de păr), care necesită interpretarea datelor obţinute ca şi posibilitatea de identificare a interferenţelor şi a cuantificării acestora. Normele în vigoare care reglementează funcţionarea şi asigurarea calităţii în laboratorul de microbiologie sunt:

- Ordinul MSP 1301/2007 /MO 617/06.11.2007 privind aprobarea Normelor privind funcţionarea laboratoarelor de analize medicale;
- Standardul 15189 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- Contract- cadru privind condiţiile acordării asistenţei medicale în cadrul sistemului de asigurări sociale de sănătate pentru anul 2010;
- Norme la Contract – Cadru;

- Ordinul MSP 1301/20.07.2007, secţiunea a 9-a Managementul calităţii, Controlul intern de calitate şi evaluarea externă a calităţii în laboratorul de analize medicale.

Sistemul analitic este definit ca ansamblul de mijloace analitice constituite dintr-o metodă, un aparat, unul sau mai multe programe informatice, unul sau mai mulţi reactivi, una sau mai multe soluţii (eşantioane) de calibrare, de control care să permită determinarea naturii unui constituent sau a concentraţiei acesteia, urmând un protocol bine definit.

Calificarea este operaţiunea destinată demonstrării faptului că un sistem analitic sau un instrument funcţionează corect şi poate furniza rezultatele aşteptate. Pentru personal, calificarea corespunde formării dobândite şi impuse de reglementările în vigoare şi care este reţinută prin formarea continuă internă sau externă a personalului de laborator.

Procedurile sunt operaţiuni de lucru, tehnici şi moduri care figurează în documentaţia scrisă a fiecărui laborator.

Transferabilitatea este calitatea unei proceduri de lucru de a permite difuzarea sa şi compararea cu rezultatele obţinute în alte laboratoare.

Valorile de referinţă sunt obţinute pe o populaţie de referinţă, exprimate în general cu limite minime/maxime, stabilite în funcţie de tehnicile utilizate sau eventual verificate, atunci când utilizează datele din literatura de specialitate.

Este preferabilă utilizarea noţiunii de **valoare de referinţă** şi nu cea de valoare "normală" sau standard.

Validarea este operaţia prin care se verifică faptul că un rezultat a fost obţinut în condiţii tehnice corespunzătoare; verificarea conformităţii condiţiilor de execuţie cu cele menţionate în procedurile de operare standard şi ţinând cont de rezultatele obţinute cu eşantioanele de control = **validare analitică** şi **validare biologică** = controlul validităţii şi coerenţei rezultatelor obţinute prin analiza unor probe, cu rezultate anterioare obţinute în laborator (WHO, 2003; REMIC, 2008).

Programele de asigurare a calităţii reprezintă o modalitate eficientă de a menţine standardele de performanţă ale laboratoarelor de diagnostic, precum şi actualizarea standardelor in vigoare atunci când este necesar. În microbiologie, calitatea ia în consideraţie durata, costul, precum şi utilitatea sau relevanţa clinică a testului.

Pentru a fi de bună calitate, un test de diagnostic trebuie să fie relevant clinic, adică trebuie să ajute la prevenirea sau tratarea bolii. Parametrii de calitate ai unui test de diagnostic sunt: fiabilitatea (rezultatul obţinut este corect?), reproductibilitate (se obţine acelaşi rezultat atunci când testul se repetă?), viteza (este un test destul de rapid pentru a fi util medicului în prescrierea tratamentului?) şi raportul cost-beneficiu (este costul de testare rezonabil în raport cu beneficiul pentru pacient şi comunitate?) (WHO, 2003).

Factorii care influenţează fiabilitatea şi reproductibilitatea rezultatelor de laborator sunt reprezentaţi de:

- **personal** (performanţa unui tehnician de laborator este direct legată de calitatea educaţiei şi a formaţiei profesionale primite, de personalul cu experienţă, precum şi de condiţiile de angajare);
- **factorii de mediu** (spaţiu inadecvat de lucru, de iluminat, sau de ventilaţie, temperaturi extreme, nivelul de zgomot excesiv sau periculos);
- **calitatea produselor biologice** - metoda şi timpul de prelevare a probelor şi sursa de recoltare sunt de multe ori în afara controlului direct al laboratorului, deşi acesta poartă responsabilitatea pentru eliberarea rezultatelor. De aceea este foarte importantă elaborarea de către laborator şi reînnoirea periodică a instrucţiunilor de recoltare şi transport al probelor şi punerea acestora la dispoziţia clinicienilor şi a întregului personal medical implicat în realizarea acestei manevre;
- **calitatea reactivilor, a produselor chimice, a sticlăriei, a mediilor de cultură, a animalelor de laborator**;
- **metoda de testare** (unele metode sunt mai fiabile decât altele);
- **echipamente** (lipsa de echipamente, utilizarea incorectă sau întreţinerea necorespunzătoare a acestora);

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **examinarea şi citirea rezultatelor** (citirea superficială sau examinarea un număr insuficient de câmpuri microscopice poate genera erori);
- **raportarea** (erori de transcriere, sau rapoarte incomplete).

Calitatea interpretării rezultatelor testului

Interpretarea este de o importanţă deosebită în microbiologie. În fiecare stadiu al diagnosticului, rezultatele ar trebui să fie interpretate în scopul de a selecta metodele de testare optime, în termeni de durată şi fiabilitate, pentru următoarea etapă de examinare.

Asigurarea calităţii în cadrul laboratorului de microbiologie

AC in microbiologie este suma tuturor activităţilor prin care un laborator garantează că rezultatele testelor realizate sunt de bună calitate. Acestea trebuie să fie cuprinzătoare pentru a acoperi fiecare etapă, de la recoltare până la raportul final către clinician (fig. 321), raţionale, pentru a permite identificarea punctelor critice, aplicate cu o periodicitate regulată, pentru a asigura monitorizarea continuă a procedurilor de testare şi cu o frecvenţă optimă, pentru a detecta şi corecta erorile atunci când apar.

Una dintre abordările comune ale implementării sistemului de asigurare şi control al calităţii (AC/CC) este "sistemul celor 5 D (engl.)" (EA 04/10, ISO/IEC 17025):

- *Decide* care sunt punctele critice în care este relevant să se realizeze managementul calităţii;
- *Descrie* cine ce face, când şi cum;
- *Realizează (engl. Do)* ceea ce ai decis şi descris;
- *Documentează* ceea ce s-a realizat în mod real;
- *Verifică (controlează) (engl. Deem)* dacă procedurile şi metodele utilizate au dat rezultatele dorite şi remediază, acolo unde este necesar.

Pentru a putea decide care sunt punctele critice de control al calităţii în cursul realizării unei analize, trebuie ca mai întâi să se schiţeze un flux de lucru de la prelevarea probelor până la raportarea rezultatelor (fig. 321). Toate etapele din fluxul de lucru vor fi analizate şi se va decide care dintre ele necesită o procedură operaţională scrisă. Este foarte important ca aceste puncte să fie corect identificate pentru că lipsa unei proceduri operaţionale poate influenţa calitatea analizei. Pe de altă parte, numărul procedurilor trebuie limitat la minimum posibil, pentru a diminua probabilitatea apariţiei erorilor rezultate din nerespectarea procedurilor scrise.

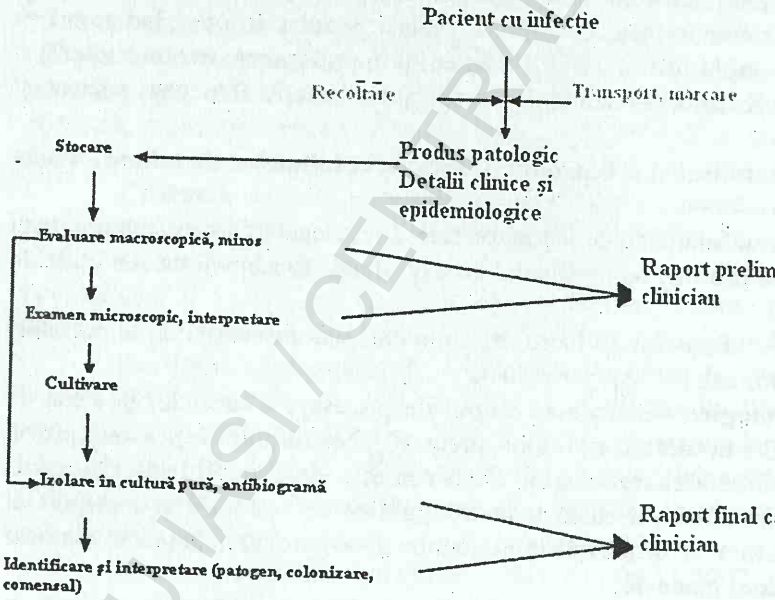


Fig. 321. Fluxul etapelor preanalitice, analitice şi post-analitice ale diagnosticului microbiologic (WHO, 2003).

Între fixarea punctelor critice pentru managementul calităţii şi realizarea practică a dezideratului, există un echilibru foarte sensibil. De exemplu, temperatura este un factor critic pentru analizele microbiologice calitative, dar există numeroase opinii şi întrebări privind modalitatea corectă de evaluare a acestui parametru: intervalul optim de monitorizare a temperaturii este cel zilnic,

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

săptamânal sau lunar? monitorizarea temperaturii se realizează într-un singur punct sau este necesar să se cunoască variația sa spațială? termometrele trebuie calibrate la fiecare °C, pentru toate temperaturile pentru care sunt utilizate sau se poate extrapola plecând de la 2 puncte de calibrare?

Un bun sistem de management al calității este cel care dă rezultate satisfăcătoare pentru sistemul AC/CC, fără a se exagera însă în realizarea acestuia. Ca regulă, se va acorda prioritate procedurilor sau echipamentelor care influențează în mod direct rezultatele analizei.

Există două tipuri de control al sistemului de asigurare a calității: intern și extern. Fiecare laborator are un program de **verificare internă** a calității (CIC) testelor efectuate care implică, în mod ideal: monitorizarea continuă a calității testării și verificarea tuturor etapelor de execuție, de la recoltare la raportare.

Controlul extern (CEC) se numește sistem de evaluare a calității, în care performanța unui laborator este controlată de către o agenție externă. În unele țări, participarea este obligatorie, fiind reglementată legal (refuzul de participare sau insuficienta participare poate antrena sancțiuni penale) și necesară pentru acreditare. Evaluarea externă a calității implică: monitorizarea periodică a calității de testare și verificarea la fața locului a metodelor de identificare și, uneori, a tehnicilor de izolare. Controlul retroactiv permite confruntarea rezultatelor interlaboratoare, în vederea ameliorării calității serviciilor prestate de laboratoarele participante. În vederea realizării CEC, organismul extern furnizează tuturor laboratoarelor același eșantion, caracterizat, colectează rezultatele obținute și le transmite împreună cu comentariile unităților participante. Participarea trebuie să fie loială, riguroasă, fidelă, pentru că datele furnizate intră în analize globale efectuate la nivel național. Rezultatele individuale și globale ale CEC trebuie cunoscute de către întreg colectivul laboratorului pentru a putea remedia erorile care au putut fi obiectivate în urma CEC, a înlocui metodele neadecvate sau a îmbunătăți sistemul de asigurare a calității în cazul în care erorile evidențiate de participarea la CEC sunt aparent inexplicabile. Deciziile impuse la nivelul laboratorului de către participarea la CEC trebuie păstrate în arhiva laboratorului timp de minimum 5 ani. Aceasta permite identificarea unor erori repetate, iar în acest caz laboratorul este inspectat de o comisie de control al calității. Se recomandă de asemenea participarea la CEC organizate de diferite organisme externe etc.

CRITERII DE CALITATE ÎN MICROBIOLOGIE

Relevanța clinică

Analiza microbiologică a diferitelor probe se realizează în scop preventiv, de diagnostic, prognostic sau terapeutic. Personalul cu studii superioare care lucrează într-un laborator de microbiologie are responsabilitatea prelevării corecte a probelor, a executării analizei de laborator a probei, validării rezultatelor și la nevoie, confruntării acestora cu date complementare (clinice, epidemiologice etc.), participând deci în mod indirect la interpretarea rezultatelor obținute. Un criteriu important de calitate pentru un test microbiologic este relevanța clinică care definește cât de mult contribuie un anumit test la prevenirea sau vindecarea bolilor infecțioase.

Relevanța clinică poate fi asigurată doar atunci când există o bună comunicare între clinician și laborator. De exemplu, dacă în sputa sau în exudatul faringian al unui pacient spitalizat sunt identificate doar câteva colonii de bacterii Gramnegative, identificarea de certitudine și realizarea antibiogramei nu au relevanță clinică, deoarece nu vor avea nici un efect asupra tratamentului pacientului. Dacă este izolat *Str. pyogenes*, antibiograma nu are nici o relevanță clinică, din moment ce benzilpenicilina este antibioticul de elecție. În cazul în care *E. coli* este izolată dintr-un caz sporadic de diaree fără urme de sânge, identificarea serotipului este lipsită de relevanță clinică, deoarece nu există nici o corespondență între serotip și patogenitate. În cazul în care un frotiu colorat Gram indică "microbiotă mixtă potențial anaerobă", identificarea de rutină a anaerobilor este lipsită de relevanță clinică. Aceasta ar fi costisitoare în timp și materiale și nu ar influența tratamentul pacientului. Dacă o levură este izolată din tractul respirator, trebuie realizate teste de identificare pentru *Cryptococcus sp.* (WHO, 2003).

Fiabilitatea

Pentru testele care dau rezultate cantitative, fiabilitatea este măsurată prin exactitatea rezultatelor (apropierea de valoarea reală): analiza concentrației antibioticului în ser, determinarea valorii concentrației minime inhibitorii (CMI), determinarea titrului de anticorpi din ser.

Pentru testele care dau rezultate calitative, fiabilitatea este măsurată prin corectitudinea rezultatului: identificarea agenților patogeni, testarea sensibilității la antibiotice prin metoda disc difuzimetrică.

Utilizarea metodelor standardizate, precum și a terminologiei standard și a nomenclaturii recunoscute pe plan internațional pentru microorganisme sunt esențiale pentru fiabilitate, de exemplu: *S. aureus*, nu "stafilococi patogeni"; *Str. pyogenes*, nu "streptococi hemolitici" (WHO, 2003).

Reproductibilitatea sau precizia unui test microbiologic este influențată de lipsa de omogenitate a probelor (o singură probă de la un pacient poate să conțină mai mult de un organism, iar culturile repetate pot duce la izolarea de organisme diferite), de lipsa de stabilitate (microorganismele dintr-o probă se pot multiplica cu rate diferite, iar pentru a îmbunătăți precizia unui test, probele ar trebui să fie testate cât mai curând posibil după recoltare).

Eficiența unui test microbiologic este capacitatea acestuia de a furniza un diagnostic corect privitor la un agent patogen sau la o condiție patologică. Acest parametru este măsurat prin sensibilitate și specificitate.

Sensibilitatea este definită ca numărul total de rezultate pozitive / numărul total de pacienți infectați. Așadar, cu cât sensibilitatea unui test este mai mare, cu atât numărul rezultatelor fals-negative este mai mic (de exemplu, sensibilitatea mediului MacConkey este slabă pentru izolarea *S. typhi* din scaun, din cauza creșterii rapide pe acest mediu a bacteriilor nepatogene intestinale) (WHO, 2003).

Specificitatea se definește ca fiind numărul total de rezultate negative / numărul total de pacienți neinfectați. Asadar, cu cât specificitatea unui test este mai mare, cu atât numărul rezultatelor fals-pozitive este mai mic (de exemplu, coloratia Ziehl-Neelsen a unui frotiu din spută este foarte specifică pentru diagnosticarea tuberculozei, dar pe un frotiu de urină este mult mai puțin specifică, deoarece oferă foarte multe rezultate fals pozitive, datorită prezenței micobacteriilor atipice) (WHO, 2003).

Sensibilitatea și specificitatea unui test sunt interdependente. Prin reducerea nivelului de discriminare, sensibilitatea unui test poate fi crescută, dar cu reducerea specificității și vice-versa.

În prezent au fost elaborate, la nivel internațional, *ghiduri de bună practică* de laborator care nu se referă în primul rând la metodele utilizate (microbiologul are libertatea de a alege metodele optime pe baza recomandărilor societăților științifice naționale sau internaționale de profil, sau validate chiar în laborator, însă în cazul din urmă, numai cu condiția ca rezultatele obținute să fie reproductibile). Ghidurile de bună practică de laborator conțin reguli care se referă în primul rând la dotarea unui laborator, la organizarea acestuia, la modalitățile de evaluare sau control intern, de înregistrare a datelor obținute în toate etapele analizelor de laborator, de la prelevarea probelor până la eliberarea rezultatelor (REMIC, 2008). Procedurile de operare, împreună cu controlul calității, reprezintă elemente ale sistemului de asigurare a calității, iar punerea lor în practică permite verificarea de către autoritățile de profil.

REGULI DE FUNCȚIONARE A UNUI LABORATOR DE CONTROL MICROBIOLOGIC

Organizarea laboratorului

Orice laborator care realizează analize microbiologice trebuie să aibă un sistem de asigurare a calității bazat pe documente scrise (proceduri de operare standard) pentru fiecare etapă a analizei microbiologice efectuate, ca și pentru condițiile de execuție (instrucțiuni de lucru). Calitatea unei analize microbiologice depinde nu numai de calitatea analizei în sine, ci și de organizarea generală a laboratorului, calificarea și motivarea personalului (ISO 17025, REMIC, 2008). Controlul intern al calității începe cu elaborarea procedurilor de operare care include toate etapele de realizare a unei analize. Manualul de operare trebuie respectat, revizuit și actualizat periodic.

Laboratorul trebuie să aibă o identitate bine stabilită în cadrul organizației din care face parte sau să aibă personalitate juridică. Organizarea și funcționarea laboratorului trebuie să îndeplinească criteriile prevăzute de lege, atât pentru sediul permanent, cât și pentru punctele de lucru sau facilitățile de analiză pe teren.

Laboratorul:

a) Va avea personal de conducere cu autoritatea şi competenţa necesare îndeplinirii sarcinilor de serviciu;
b) Va aduce dovezi că personalul de laborator nu este supus nici unei presiuni de ordin financiar sau comercial care ar putea influenţa negativ calitatea muncii sale;
c) Acolo unde este cazul vor fi nominalizaţi manageri adjuncţi pentru a suplini personalul de conducere când acesta lipseşte din laborator;
d) Participă la exerciţii de inter-comparare între laboratoarele de profil.

Sistemul calităţii:

Documentaţia sistemului calităţii dintr-un laborator trebuie să conţină pe lângă procedurile operaţionale, următoarele documente adiţionale:

a) lista personalului de laborator cu semnătură autorizată;
b) procedura laboratorului pentru realizarea trasabilităţii măsurării;
c) unde este cazul, o procedură care stabileşte cum se documentează şi se urmăresc toate modificările introduse în activitatea de analiză curentă;
d) procedurile pentru echipamentele majore şi materialele de referinţă utilizate;
e) procedura pentru acţiuni corective;
f) procedura pentru reclamaţii;
g) procedura pentru păstrarea confidenţialităţii şi proprietăţii intelectuale, dacă este cazul.

Atunci când este nevoie de implementarea unor acţiuni corective, acestea trebuie documentate. Responsabilul cu asigurarea calităţii va supraveghea punerea în aplicare a acestor măsuri, cu respectarea calendarului stabilit.

Laboratorul va asigura calitatea rezultatelor furnizate pacienţilor, prin implementarea unor controale periodice. Procedura de control face obiectul reviziilor periodice şi va include cel puţin următoarele aspecte:

a) participarea la exerciţii de inter-comparare şi teste de capabilitate;
b) utilizarea cu regularitate a materialelor de referinţă şi/sau materialelor cu caracteristici cunoscute, preparate în laborator, ca parte a controlului de calitate al laboratorului;
c) repetarea analizelor pe probele conservate (contra probe), unde este cazul.

Organizarea unui sistem de calitate în laborator este responsabilitatea unei persoane desemnate de către director sau de şeful de laborator **cu asigurarea calităţii** şi priveşte mai multe aspecte:

Stabilirea unei organigrame a laboratorului:

- stabilirea fişelor de post (se asigură că personalul corespunde din punctul de vedere al numărului, educaţiei, instruirilor periodice, cunoştinţelor tehnice şi experienţei, pentru funcţiile pe care le ocupă şi domeniul de activitate declarat);
- asigură formaţia personalului pentru o anumită sarcină şi instruirea permanentă a personalului;
- pune la dispoziţia personalului procedurile de operare şi instrucţiunile de lucru cuprinse în ghidurile de specialitate;
- informează personalul cu privire la orice decizie sau introducere de noi proceduri sau instrucţiuni de lucru;
- menţine înregistrările relevante privind calificarea, instruirea, aptitudinile, experienţa şi competenţa personalului;
- se asigură că normele de protecţia muncii sunt cunoscute, respectate şi aplicate.

Obligaţiile personalului cu studii superioare din laborator:

- validarea analizelor (tehnică şi biologică);
- semnarea buletinelor;
- transmiterea lor fără întârziere.

Obligaţiile personalului:

- trebuie să se conformeze la toate procedurile şi instrucţiunile de lucru în vigoare din laborator.

BCU "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

Spațiul și condițiile de mediu:

- clădirea laboratorului, spațiile de testare, sursele de energie, iluminatul, sistemul de încălzire și ventilația, trebuie să asigure condițiile optime de realizare a analizelor (laboratorul de microbiologie necesită spații luminate, aerate și fără praf);
- condițiile de mediu în spațiile în care se desfășoară analizele trebuie să nu conducă la invalidarea rezultatelor sau să influențeze negativ acuratețea și precizia măsurării; trebuie acordată o atenție deosebită acestor aspecte atunci când analizele se desfășoară în alte spații decât cele permanente ale laboratorului;
- se va asigura o separare efectivă a spațiilor învecinate în care se desfășoară activități incompatibile;
- accesul și utilizarea spațiilor destinate analizelor vor fi definite și controlate;
- se vor asigura curățenia și buna gospodărire a laboratorului.

Procedurile de lucru:

- toate etapele de lucru din fazele pre-analitică, analitică și post-analitică ale încercării (analizei), trebuie documentate în proceduri de operare standard (POS);
- procedurile în vigoare, scrise, verificate, aprobate, datate sunt respectate de către personal;
- revizuirile procedurilor sunt notate, aprobate, înregistrate, datate și comunicate întregului personal al laboratorului;
- se întocmesc fișe cronologice ale tuturor operațiunilor (fluxuri de lucru) care să permită supravegherea respectării instrucțiunilor de lucru;
- în cazul în care se semnalizează o eroare de funcționare sau de executare, responsabilul cu calitatea ia inițiativa înlocuirii acesteia și înregistrează acțiunile corective întreprinse; responsabilul cu calitatea asigură gestionarea adecvată a arhivelor.

Instalațiile, echipamentul, instrumentarul, consumabilele, reactivii, materialele de referință:

- laboratorul va fi dotat cu toate echipamentele și materialele de referință necesare pentru desfășurarea corectă a analizelor;
- echipamentele vor fi menținute în mod corespunzător, activitatea fiind documentată de proceduri;
- orice echipament defect sau care produce rezultate suspecte va fi scos din uz, clar marcat și depozitat pe cât posibil într-un spațiu exterior zonei de desfășurare a analizelor, până când va fi reparat și se va demonstra prin teste de calibrare și verificare că a atins o performanță satisfăcătoare. Laboratorul este obligat să examineze influența utilizării acestui echipament asupra rezultatelor analizelor anterioare;
- în cazul în care laboratorul utilizează echipamente care nu sunt în proprietatea și/sau controlul său, va lua toate măsurile necesare pentru a se asigura că se respectă cerințele prevăzute în standarde;
- toate consumabilele, reactivii, sunt în termen, disponibili, conservați în condiții bine definite, conform reglementărilor în vigoare, adaptate la evoluția cunoașterii științifice și datelor tehnice;
- resursele informatice utilizate pentru controlul, verificarea aparatelor sau pentru interpretarea rezultatelor trebuie autorizate și actualizate.

Trasabilitatea măsurării și calibrarea:

- programul de calibrare/verificare și de validare a echipamentelor și a materialelor de referință va fi elaborat și pus în aplicare astfel încât să asigure trasabilitatea la sistemul național a măsurărilor efectuate de laborator;
- materialele de referință sau substanțele etalon vor fi utilizate de laborator numai în scopul calibrării, dacă nu se pot prezenta dovezi obiective că performanța lor ca materiale de referință nu se invalidează prin utilizare în activitatea curentă.

Amenajarea și întreținerea instalațiilor:

- construcția și localizarea trebuie să respecte reglementările;
- amenajarea trebuie să permită izolarea activităților cu risc de contaminare pentru operator și/sau probă (evitând așadar contaminarea la interior sau la exterior);

BCU "IOAN SLAVICI" UNIVERSITY LIBRARY

- trebuie să fie prevăzute spații de stocare la diferite temperaturi a materiilor prime, a reactivilor, separate de cele utilizate pentru stocare probelor. Reactivii şi materiile prime toxice sau periculoase se depozitează separat, în condiții de securitate pentru personal şi calitatea analizei probei, iar pe ambalajul lor trebuie să fie vizibile mențiunile: "coroziv", "iritant" sau "toxic";
- trebuie să existe proceduri scrise privind modalitatea de întreținere a laboratorului.

Securitate:
- respectarea normelor regulamentare pentru evitarea riscului de incendiu şi explozie;
- instalațiile de distribuire a gazului trebuie să respecte regulamentele şi să fie verificate de personal autorizat;
- substanțele inflamabile, periculoase, radioactive trebuie conservate regulamentar.

Instrumentar, echipamente:
- fiecare aparat trebuie să fie prevăzut cu o carte tehnică;
- să fie adecvat pentru analizele microbiologice efectuate;
- să fie validate, întreținute, curățate, verificate periodic (metrologic).

Minim necesar pentru laboratorul de microbiologie:
- centrifugă;
- două termostate;
- dispozitiv de anaerobioză;
- hotă cu flux laminar;
- congelator –80°C, tanc azot lichid după caz;
- microscop optic;
- microscop inversat (pentru virologie);
- micrometru optic (pentru parazitologie);
- dispozitiv de colorare a lamelor.

Materiale şi reactivi:
- achiziționate din surse conforme cu normele specifice folosite;
- conservate corespunzător, conform modului de utilizare prevăzut de furnizor;
- reactivii preparați şi/sau reconstituiți în laborator trebuie să poarte data preparării şi cea a valabilității soluției obținute. Prepararea, respectiv reconstituirea este prevăzută în proceduri de operare sau instrucțiuni de lucru;
- toți reactivii expirați trebuie eliminați.

Mijloace informatice:
- accesul total sau parțial la date trebuie limitat la personalul autorizat. Materialul informatic trebuie protejat față de accesul extern al persoanelor neautorizate;
- modificarea programelor sau a informațiilor conținute trebuie realizată numai de persoane autorizate, iar modificările trebuie înregistrate.

Responsabilul de menținere a sistemului informatic garantează că:
- personalul implicat respectă regulile secretului profesional;
- sistemul este configurat şi protejat pentru asigurarea confidențialității;
- orice modificare se realizează de personal calificat, doar la cererea responsabilului de laborator şi face obiectul unui proces verbal detaliat, semnat, înregistrat şi postat în arhiva laboratorului.

Eliminarea deşeurilor:
- conform legislației şi reglementărilor în vigoare;
- se separă în două categorii: deşeuri cu risc şi deşeuri asimilabile celor menajere;
- deşeurile cu risc sunt separate în trei grupe:
  a) potențial contaminate;
  b) produşi toxici sau chimici;
  c) produşi radioactivi.
- pentru fiecare din cele 3 grupe, trebuie să existe proceduri privind modalitățile specifice de condiționare, stocare, transport, tratare şi pretratare sau eventual un contract cu o societate de profil pentru realizarea acestor proceduri;

BCU "I.C. BRĂTIANU" UNIVERSITY LIBRARY

– deşeurile asimilabile celor menajere sunt depozitate în containere care intră în circuitul de eliminare al deşeurilor menajere (pentru care trebuie sî existe acordul colectivităţii locale).

Execuţia analizelor de laborator:

Laboratorul va avea proceduri de utilizare a tuturor echipamentelor relevante, instrucţiuni de manipulare şi pregătire pre-analitică a probelor şi proceduri de lucru pentru metodele care în lipsa unor asemenea precizări, ar pune în pericol corectitudinea rezultatelor.

Manualul propriu al laboratorului reprezintă o cerinţă absolut necesară pentru AC deoarece:

– menţine şi îmbunătăţeşte calitatea serviciilor laboratorului oferite pacientului şi identifică problemele rezultate din practici greşite;
– furnizează personalului instrucţiuni scrise despre efectuarea testărilor conform standardelor acceptate în laborator;
– ajută la evitarea omisiunilor care apar în execuţia testelor;
– furnizează tehnici standardizate scrise, utilizate în pregătirea personalului;
– facilitează pregătirea listelor de inventar pentru reactivi, medii şi echipamente;
– promovează practicile corecte de biosiguranţă în laborator.

Procedurile se referă la:

– curăţarea spaţiului de lucru;
– igiena personală;
– măsuri de precauţie – siguranţă (zone pentru luarea mesei şi fumat situate în afara spaţiului de lucru, manipularea şi eliminarea materialelor infectate, vaccinările corespunzătoare pentru personal, de exemplu, pentru hepatita B);
– asistenţa de rutină şi întreţinerea echipamentelor;
– prelevarea probelor;
– înregistrarea probelor;
– eliminarea probelor necorespunzatoare;
– pregătirea mediilor de cultură (indiferent dacă sunt achiziţionate gata preparate sau sunt produse în laborator din ingrediente de bază, trebuie să se asigure un stoc minim de medii care să acopere gama de analize efectuate: de exemplu o bază de agar-agar care poate fi utilizată pentru pregătirea gelozei sânge, gelozei chocolat şi a mai multor medii selective; un mediu foarte selectiv, agar *Salmonella, Shigella* sau dezoxicolat citrat şi unul mai puţin mediu selectiv, agar MacConkey, necesare pentru izolarea enterobacteriaceelor patogene din probe de materii fecale etc.; cantităţile maxime de mediu care pot fi comandate trebuie epuizate în 6 luni, sau cel mult 1 an; cantitatea totală ar trebui să fie ambalată în containere cu cantităţi ce vor fi utilizate în maxim două luni) (WHO, 2003);
– transportul probelor;
– eventualele tratamente prealabile ale probei;
– recepţia probelor;
– conservarea probelor înainte şi după analize;
– prelucrarea probelor;
– înregistrarea rezultatelor;
– raportarea rezultatelor;
– asigurarea calităţii;
– gestionarea sistemelor informaţionale eventual existente.

Toate instrucţiunile, standardele de metodă, manualele şi literatura de referinţă relevante pentru domeniul de activitate a laboratorului, vor fi menţinute la zi şi vor fi accesibile personalului de laborator.

Laboratorul va avea un sistem documentat pentru identificarea unică a probelor de analizat, pentru a preveni orice confuzie legată de identitatea acestora.

Laboratorul va avea proceduri şi facilităţi adecvate pentru a preveni deterioararea probelor în timpul depozitării, manipulării, pregătirii şi analizei. În situaţiile în care probele trebuie depozitate şi/sau pregătite în condiţii speciale de mediu, acestea vor fi asigurate, monitorizate şi înregistrate. În cazul în care o probă sau o parte dintr-o probă trebuie păstrată pentru repetarea analizelor (contra-proba), laboratorul va asigura toate condiţiile pentru păstrarea integrităţii şi securităţii acesteia.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unde este cazul, laboratorul va avea proceduri pentru recepţia şi păstrarea în siguranţă a contra-probelor.

Procedurile pot avea anexe (de exemplu, fişa de înregistrare a probelor). Numărul procedurilor trebuie să fie unic, iar unele pot fi comune cu cele din alte laboratore (de exemplu, procedurile de înregistrare a reactivilor chimici, de calibrare a pipetelor şi balanţelor).

Este de dorit ca toate procedurile să respecte un format unic, care sa cuprindă următoarele puncte (REMIC, 2008):

- titlu unic;
- scopul procedurii;
- procedura;
- responsabilităţi;
- numele autorului şi al persoanei care aprobă;
- data aprobării, perioada de valabilitate, ediţia.

Laboratorul va utiliza metode de analiză şi proceduri de testare adecvate scopului, inclusiv pentru prelevarea probelor, manipularea, transportul, depozitarea şi pregătirea lor. Performanţele metodelor de analiză vor respecta limita de detecţie, precizia şi acurateţea recomandate de legislaţia în vigoare, în domeniul apei.

Ori de câte ori este necesară utilizarea unei metode nestandardizate, se va obţine acordul pacientului, iar metoda de analiză va fi documentată, validată, documentaţia rezultată fiind accesibilă solicitantului sau altor persoane responsabile.

Atunci când prelevarea probelor este parte integrantă a metodei de analiză, laboratorul va documenta această situaţie printr-o procedură specială. Dacă sunt aplicabile, se vor utiliza tehnici statistice pentru eşantionare.

Dacă se utilizează echipamente automate asistate de calculator pentru prelevarea, pregătirea, manipularea, înregistrarea, raportarea şi arhivarea rezultatelor analizelor, laboratorul se va asigura că:

a) sunt îndeplinite criteriile prezentului document;
b) *soft*-ul utilizat este adecvat şi documentat;
c) sunt stabilite şi implementate proceduri referitoare la protejarea integrităţii datelor; aceste proceduri vor include cel puţin securizarea datelor introduse, prelucrate, transmise, arhivate;
d) calculatoarele şi echipamentele automate vor fi menţinute în stare de funcţionare adecvată prin asigurarea condiţiilor de mediu şi de operare;
e) se vor stabili şi implementa proceduri pentru menţinerea securităţii datelor, inclusiv prin prevenirea accesului neautorizat.

Unde este cazul vor exista proceduri pentru achiziţionarea, recepţia şi depozitarea materialelor consumabile utilizate în activitatea de laborator.

Sub-contractarea analizelor:

Sub-contractarea anumitor analize se va face doar cu un laborator cu un nivel de competenţă cel puţin echivalent cu al laboratorului care trimite analizele, iar pacientul va fi notificat.

Înregistrarea rezultatelor:

Laboratorul va menţine un sistem de înregistrare a rezultatelor, adecvat activităţii sale, în concordanţă cu prevederile prezentului document. Laboratorul va înregistra toate observaţiile şi calculele originale şi o copie după buletinele de analiză pe o perioadă considerată ca adecvată. Înregistrările referitoare la fiecare analiză vor conţine suficiente informaţii pentru a permite repetarea lor. Acolo unde este cazul, înregistrările conexe, ca de exemplu calibrările, vor fi arhivate pe o perioadă considerată adecvată.

Stocarea şi conservarea arhivelor:

- rezultatele analizelor trebuie păstrate 5 ani (puse la dispoziţia controalelor externe de calitate);
- procesele verbale privind măsurile luate pentru corectarea erorilor evidenţiate în urma CEC – 5 ani;
- rezultatele CIC – 3 ani;
- 1 exemplar din manualul calităţii – 3 ani;
- contractele cu societăţile de profil şi documentele legate de eliminarea deşeurilor – 3 ani;
- documentaţia privind reactivii şi consumabilele – pe durata utilizării lor;
- documentele referitoare la modificările programelor informatice;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- arhiva trebuie depozitată într-un loc adecvat şi care să asigure confidenţialitatea datelor;
- laboratorul va avea proceduri pentru înregistrarea electronică a datelor. Dacă arhiva este informatică se iau măsuri de evitare a pierderii de informaţie (copii multiple pe CD-ROM – cel puţin două, una pentru consultări, una pentru păstrare).

Raportarea rezultatelor:

Rezultatele fiecărei analize sau serii de analize efectuate de laborator vor fi raportate cu acurateţe, clar, neambiguu şi obiectiv, în conformitate cu instrucţiunile din metoda de analiză.

Rezultatele vor fi raportate sub forma unui buletin de analiză care va include toate informaţiile necesare pentru interpretarea rezultatelor şi toate informaţiile cerute de utilizarea metodei de analiză.

Buletinul de analiză se transmite imediat ce rezultatul analizei este obţinut.

Buletinul de analiză va include cel puţin următoarele informaţii:

- titlul, de exemplu "Buletin de analiză";
- denumirea şi adresa laboratorului şi locul în care a fost efectuată analiza;
- identificarea unică a buletinului de analiză;
- unde este cazul, numele şi adresa solicitantului;
- descrierea şi identificarea neambiguă a probelor analizate;
- caracterizarea probei şi condiţiile în care aceasta a fost analizată;
- data şi ora la care proba a fost recepţionată, data şi ora la care a fost analizată;
- specificarea metodei de analiză utilizate şi descrierea neambiguă a oricărei alte metode de analiză nestandardizate utilizate;
- detalii despre procedura de prelevare a probei;
- se va menţiona orice abatere de la metoda de analiză standardizată şi orice altă informaţie relevantă, ca de exemplu condiţiile de mediu;
- măsurările, examinările şi rezultatele derivate, însoţite de tabele, grafice, schiţe sau fotografii după caz şi orice abateri constatate;
- estimarea incertitudinii în măsurare;
- semnătura şi funcţia persoanei responsabile pentru conţinutul buletinului de analiză şi data eliberării buletinului;
- unde este relevant, declaraţia "rezultatele se referă exclusiv la proba analizată";
- declaraţia "acest buletin de analiză nu va fi reprodus parţial, fără acordul scris al laboratorului";
- în cazul în care buletinul de analiză conţine rezultate ale unor analize sub-contractate, aceste rezultate vor fi clar marcate;
- se va acorda atenţie formei grafice a buletinului de analiză, astfel încât acesta să fie uşor de citit; formatul poate fi adaptat fiecărui tip de analiză, dar antetul se recomandă a fi standardizat;
- materialele adiţionale buletinului de analiză vor fi organizate într-un document separat, intitulat de exemplu "Raport suplimentar la buletinul de analiză nr....", care va primi un număr de ordine;
- laboratorul va notifica în scris, cu promptitudine, solicitantul, asupra oricărui eveniment care produce dubii asupra validităţii rezultatelor înscrise în buletinul de analiză;
- unde este cazul, laboratorul va asigura transmiterea rezultatelor către pacient, prin telefon, fax, alte mijloace electronice sau pe suport magnetic, pe baza unei proceduri care respectă prevederile în vigoare şi confidenţialitatea datelor;
- raportarea rezultatelor va respecta toate cerinţele legislaţiei în vigoare.

AUTORIZAŢIA DE DESCHIDERE A UNUI LABORATOR

Un laborator poate fi deschis doar de o persoană fizică, societate civilă profesională sau societate anonimă sau societate cu responsabilitate limitată, un organism sau serviciu de stat, de un departament, o instituţie publică, un organism mutualist sau de securitate socială, un organism cu scop nelucrativ cu utilitate publică necunoscută, care posedă o autorizaţie eliberată de MS. Şeful laboratorului trebuie să aibă o diplomă în medicină, medicină veterinară, farmacie sau o formaţie specializată, certificate de studii aprofundate, echivalenţe, derogări. Tehnicienii trebuie să aibă diplome eliberate de instituţiile aprobate de MS.

BCU "ASE" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CIC se realizează în special cu **probe de referinţă** (materiale sau substanţe ale căror proprietăţi sunt suficient de omogene şi bine stabilite pentru a putea fi folosite pentru calibrarea unui aparat, evaluarea, compararea şi validarea unei metode de măsurare, pentru evaluarea calităţii altor materiale, demonstrarea acurateţii rezultatelor, monitorizarea performanţelor laboratorului (ISO Guide 30:1992). Pe cât posibil, materialele de referinţă trebuie utilizate în condiţii adecvate (conform standardelor şi recomandărilor producatorului). **Metoda de referinţă** este o metodă de investigare standard naţională sau internaţională, completă, cu acurateţe şi precizie demonstrate, care descrie cu claritate şi exactitate condiţiile şi procedurile necesare pentru măsurarea uneia sau mai multor valori proprii şi poate fi utilizată pentru evaluarea acurateţii altor metode pentru aceeaşi analiză sau pentru caracterizarea unui material de referinţă. În laboratorul de microbiologie se controlează echipamentele (tabelul 30), mediile de cultură (tabelul 31, 32), discurile de antibiogramă, materialele de lucru, sistemele de testare automată şi se asigură verificarea competenţelor şi performanţelor personalului (ISO 15189, ISO 17025, L53/2005 şi OUG 65/2005).

Organizarea controlului intern al calităţii este responsabilitatea şefului de laborator de analize medicale, iar reprezentantul legal al laboratorului de analize medicale are obligaţia de a asigura resursele necesare îndeplinirii acestuia. CIC se efectuează zilnic, săptămânal, lunar sau ori de câte ori este nevoie. Rezultatele obţinute se analizează de către specialistul responsabil de analiza respectivă, care decide acceptarea sau respingerea acestora (Ord. MSP 1301/20.07.2007). În laboratorul de microbiologie se controlează toate materialele, echipamentele şi procedurile de lucru. CIC trebuie să fie practic (util), realizabil (să se poată aplica) şi abordabil (costuri accesibile).

Laboratorul de microbiologie trebuie să cuprindă:

- un local de recepţie;
- un birou de secretariat şi arhivă;
- sală de prelevare a probelor;
- spălătorie;
- cameră pentru efectuarea propriu-zisă a analizelor.

Tabelul 30.

Controlul de calitate al echipamentelor.

Echipament	Întreţinere de rutină	Monitorizare	Mentenanţă tehnică şi inspecţie
Jar de anaerobioză	Se curăţă săptămânal Se reactivează catalizatorul după fiecare utlizare (160°C, 2h). Se înlocuieşte catalizatorul odată la 3 luni.	Se utilizează de fiecare dată albastru de metilen ca indicator.	Se verifică săptămânal etanşeitatea garniturilor.
Autoclav	Curăţare şi schimbarea apei lunar. Maxim 2 l de mediu.	Verificarea şi ajustarea nivelului apei înainte de fiecare utilizare. Înregistrarea timpului şi temperaturii de sterilizare la fiecare utilizare. Verificarea performanţei săptămânal cu suspensii de spori de *Bacillus stearothermophilus* sau testul Bowie Dick.	Verificare o dată la 6 luni
Centrifugă	Ştergerea pereţilor interiori cu antiseptic săptămânal sau în caz de contaminare.		Înlocuirea anuală a periilor.
Etuvă	Curăţarea interiorului o dată pe lună.	Înregistrarea timpului şi temperaturii de sterilizare la fiecare utilizare.	Verificare o dată la 6 luni.
Incubator	Curăţarea interiorului şi a rafturilor o dată pe lună.	Înregistrarea temperaturii la începutul zilei (35 +/- 1°C).	Verificare o dată la 6 luni.
Microscop	Ştergerea lentilelor cu material textil sau hârtie specială în fiecare zi. Curăţarea părţii mecanice o dată pe săptămână. Acoperire pentru protejarea de praf.	Verificarea alinierii condensorului o dată pe lună.	Verificare anuală.
Frigider	Curăţare şi decongelare o dată la 2 luni şi după pană de curent.	Înregistrarea temperaturii în fiecare dimineaţă (2-8°C).	Verificare o dată la 6 luni.
Baie de apă	Curăţarea interiorului şi schimbarea apei o dată pe lună.	Verificare zilnică a nivelului apei. Înregistrarea temperaturii în prima zi din fiecare săptămână.	Verificare o dată la 6 luni.
Hota bacteriologică	Dezinfecţie şi curăţire săptămânală.	Înregistrarea presiunii aerului la fiecare deschidere.	Verificare anuală.
Deionizator de apă		Zilnic - citirea rezistivităţii. Săptămânal- culturi pentru testarea microbiologică.	
Pipete automate			Verificare bianuală.

Mediile de cultură

Mediile de cultură pot fi preparate în laborator din ingredientele de bază sau din pulberi deshidratate disponibile în comerț, sau pot fi achiziționate gata de utilizare.

Pulberile deshidratate comerciale sunt recomandate, deoarece se pot transporta și stoca ușor, iar calitatea este potențial mai bună decât a celor preparate în laborator din ingrediente. Acestea trebuie însoțite de certificate de calitate, care să ateste performanțele privind creșterea și supraviețuirea microorganismului țintă și inhibarea sau supresarea creșterii altor microorganisme.

Calitatea mediilor depinde de **calitatea materialelor utilizate pentru obținerea lor**, în special de **calitatea apei** (concentrația în ioni de Ca nu trebuie să depășească o anumită valoare, deoarece Ca are efect inhibitor asupra creșterii microorganismelor, conductivitatea < 15 μS și valoarea pH nu mai mică de 5,5) și **calitatea placilor Petri** (se utilizează numai plăci din plastic borosilicat care nu eliberează alkali în mediu, iar limita maximă admisă de reziduu toxic de EtO (etilenoxid) este de 1 μg/g). Pentru rehidratarea mediilor deshidratate se va folosi apa demineralizată, distilată sterilă.

Controlul calității aditivilor este de asemenea foarte important.

Controlul sterilității sângelui se realizează în două etape:

1) Testarea inițială (se înregistrează în registrul de control: specia animală de la care a provenit lotul de sânge, numărul lotului și data expirării, se scoate steril cu o seringă o cantitate de 2,5 ml și se însămânțează într-un flacon de hemocultură care se incubează, iar flaconul original se refrigerează):

- dacă proba de control se pozitivează este anunțat responsabilul de calitate, se face colorație Gram, se face subcultivare pe geloză sânge, se identifică specia contaminantă și se scoate din uz flaconul cu sânge;
- dacă proba de control este negativă, sângele se introduce în lucru pentru prepararea mediilor cu sânge.

2) Testarea finală (câteva picături din flaconul utilizat se cultivă pe o placă de mediu cu sânge, se incubează la 35°C, 48 ore, apoi la temperatura camerei încă 48 ore, iar rezultatul se înregistrează în registrul de control al mediilor cu sânge).

Mediile preparate trebuie controlate vizual privind caracteristicile fizice: prezența neregularităților și a bulelor de aer, grosimea (optimă 4.0 ± 0.2 mm) neuniformă a stratului de mediu repartizat în placă, uscarea sau deshidratarea mediului, înghețarea sau cristalizarea acestuia în placă.

Mediile trebuie alese conform analizelor efectuate. Unele pot avea utilizări foarte diverse, altele foarte speciale. De exemplu o bază de agar este utilizată pentru prepararea gelozei sânge, gelozei chocolat și a mai multor medii selective. Un mediu înalt selectiv (agar-*Salmonella Shigella* sau dezoxicolat citrat agar) și unul mai puțin selectiv (agar MacConkey) sunt necesare pentru izolarea enterobacteriilor patogene din probe de materii fecale. Pentru izolarea *Campylobacter* spp. este necesar un mediu special (WHO, 2003).

Se comandă de obicei cantitățile de medii care vor fi folosite timp de 6 luni, sau cel mult 1 an.

Cantitatea totală ar trebui să fie ambalată în containere care vor fi utilizate maxim în 1–2 luni.

La recepția mediilor, se asigură că recipientele sunt bine închise. Deoarece mediile deshidratate pot absorbi apa din atmosferă după ce sunt depozitate într-un mediu cu umiditate ridicată, capacele se izolează cu ceară de parafină.

Se notează data primirii pe fiecare recipient.

Se depozitează la întuneric, loc răcoros, bine ventilat.

Se rotește stocul, astfel încât materialele mai vechi să fie utilizate primele.

Se notează data deschiderii recipientului.

Se aruncă mediile deshidratate întărite sau care și-au schimbat culoarea.

Se ține o evidență scrisă a stocului de medii.

Stocarea mediilor de cultură

Mediile se păstrează la loc ferit de lumină și căldură.

Mediile care conțin sânge, alte lichide organice sau antibiotice se păstrează la frigider (mediile repartizate în tuburi cu dopuri de vată/ tifon, timp de 2–3 săptămâni, cele cu capac cu filet, 3 luni, iar mediile rapartizate în plăci Petri, 4 săptămâni).

Acuratețea compoziției mediilor, diluenților și fluidelor de suspensie, preparate în laborator, trebuie verificată în ceea ce privește asigurarea supraviețuirii organismului țintă, inhibarea sau

supresia creşterii altor organisme, proprietăţile biochimice (medii diferenţiale, speciale) şi proprietăţile fizice (pH, volum şi sterilitate) (EA - 4/10).

Controlul calităţii mediilor preparate (tabelul 32, 33)

1. **Testarea pH**. Valoarea pH a mediului preparat nu trebuie să fie verificată atunci când este corect preparat din mediu deshidratat. În schimb, verificarea este necesară în cazul în care mediul este preparat din ingrediente de bază. Mediul trebuie lăsat să se răcească înainte de testarea pH. Mediile solide ar trebui testate cu un electrod de suprafaţă sau după macerare în apă distilată. Dacă pH diferă cu mai puţin de 0,2 unităţi faţă de cel din caietul de sarcini, acesta se ajustează cu soluţie de acid sau respectiv, soluţie bazică.

2. **Controlul sterilităţii**. Se recomandă atunci când la baza solidă se adaugă componente precum sângele, după autoclavare. Se prelevează 3–5% din fiecare lot şi incubează la 35°C, timp de 2 zile. Restul se păstrează la frigider. Dacă pe placă apar mai mult de două colonii, se aruncă întregul lot.

3. **Testarea performanţelor de creştere microbiană (CLSI M22-A2. CLSI M22-A3)**. Laboratorul trebuie să deţină întotdeauna un set proaspăt de tulpini de referinţă (selectate dintre tulpinile de lucru, sau obţinute din surse comerciale sau oficiale) pentru monitorizarea performanţei mediilor de cultură:

- se prepară o suspensie de densitate McFarland 0.5 (10^7–10^8 UFC/mL) sau cu absorbanţa de 0.08–0.1 măsurată la 625 nm;
- se incubează pe durata de timp recomandată în mod curent pentru mediul respectiv;
- se citesc plăcile;
- se ţine o evidenţă corectă a rezultatelor.

Evaluarea creşterii microorganismelor se realizează prin metode relative (mărimea coloniilor, caracteristicile coloniilor) sau obiective (metoda ecometrică, metoda proporţiilor).

Tabelul 31.

Tulpini de referinţă recomandate pentru controlul mediilor (WHO, 2003).

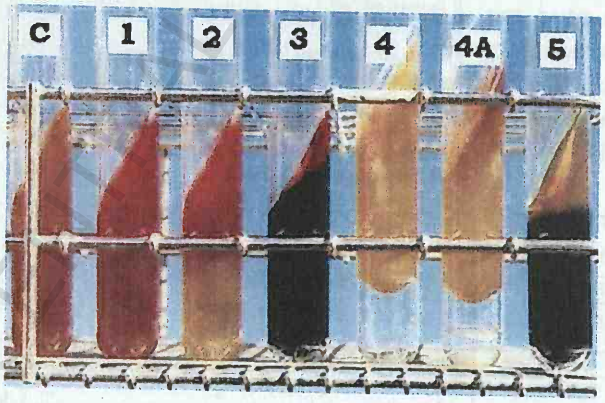
CGP	Enterobacterii	Bacterii Gram negative fastidioase
Enterococcus faecalis (ATCC 29212) *S. aureus* (ATCC 25923) *S. epidermidis* *Str. agalactiae* *Str. mitis* *S. typhimurium* *Str. pneumoniae* *Str. pyogenes*	*Citrobacter freundii* *Enterobacter cloacae* *K. pneumoniae* *Proteus mirabilis* *E. coli* (ATCC 25922) *Serratia marcescens* *Sh. flexneri* *Yersinia enterocolitica*	*Moraxella catarrhalis*, *H. influenzae* tip b beta-lactamază-negativ beta-lactamază-pozitiv *H. parainfluenzae* *N. gonorrhoeae* *N. meningitidis*
Fungi	Alţi BGN	Anaerobi
C. albicans	*Acinetobacter lwoffi* *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853) *V. cholerae* (non-01)	*Bacteroides fragilis* *Cl. perfringens*

Tabelul 32.

Teste de performanţă realizate pe mediile uzuale (WHO, 2003).

Mediu	Tulpina testată	Prezenţa creşterii/aspectul coloniilor sau mediului
Agar bilă esculină 24h	*Enterococcus faecalis*	Da/înnegrirea mediului
	Streptococcus α-hemolitic	Nu
Geloză sânge, 24h, CO2	*Str. pyogenes*	Da/ β-hemoliză
	Str. pneumoniae	Da/ α-hemoliză
Geloză chocolat, 24h, CO2	*H. influenzae*	Da
Decarboxilaze Lizină 48h	*S. typhimurium*	+
	S. flexneri	–
Ornitină 48h	*S. typhimurium*	+
	K. pneumoniae	–
Arginin-dihidrolază 48h	*S. typhimurium*	+
	Proteus mirabilis	+
Gelatinază 24h	*E. coli*	–
	Serratia marcescens	+
TSI (porţiunea dreaptă de min. 2.5 cm) (fig. 322)	*S. typhimurium* *S. flexneri* *A. lwoffi* *Citrobacter freundii*	Pantă roz, gaz + H_2S Pantă roz, gaz Mediu nemodificat Pantă galbenă, gaz + H_2S

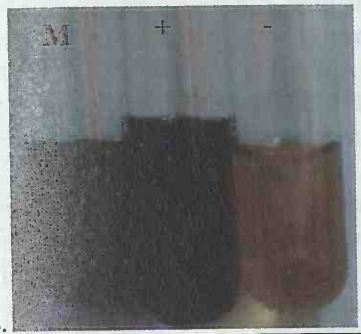
MacConkey cu cristal violet 24h	*E. coli*	Colonii roşii
	P. mirabilis	Colonii incolore, neinvazive
	E. faecalis	–
Malonat -24h	*E. coli*	• (verde)
	K. pneumoniae	+ (albastru)
Agar Manitol Sare 24h	*S. aureus*	Colonii galbene
	S. epidermidis	Colonii roşii
	E. coli	–
Roşu metil/Voges–Proskauer 48h	*E. coli*	+/–
	K. pneumoniae	–/+
Agar Mueller–Hinton 24h	*E. coli* ATCC 25922	Zone de inhibiţie corespunzătoare
	S. aureus ATCC 25923	
	Ps. aeruginosa ATCC 27853	
Bulion cu nitrat 24h	*E. coli*	+
	Acinetobacter lwoffi	–
Oxidare/fermentaţie 24h	*Ps. aeruginosa*	Oxidare la suprafaţă
Dextroză	*A. lwoffi*	Nici o modificare
Apă peptonată (indol) 24h	*E. coli*	+
	K. pneumoniae	–
Fenilalanin -dezaminază /24h Cu $FeCl_3$	*E. coli*	–
	P. mirabilis	+
Agar *Salmonella–Shigella* 24h	*E. coli*	–
Dezoxicolat citrat agar 24h	*S. typhimurium*	Colonii incolore
	Y. enterocolitica	Colonii incolore
	S. flexneri	Colonii incolore
Bulion selenit 24h	*S. typhimurium*	Creştere după subcultivare
	E. coli	–
Citrat Simmons 48 h	*E. coli*	–
	K. pneumoniae	+, albastru
Tiosulfat citrat săruri biliare 24h	*Vibrio* spp.	Colonii galbene
Agar Thayer–Martin 24h, CO_2	*N. meningitidis*	+
	N. gonorrhoeae	+
	Staphylococcus spp	–
	E. coli	–
	Candida	–
Bulion tioglicolat 24h	*Bacteroides fragilis*	+
Uree 24h	*E. coli*	–
	P. mirabilis	+ (roz)



A.

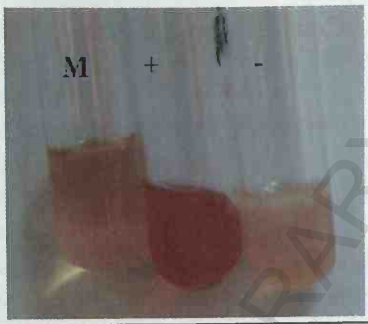
Tub neînsămânţat	1	2	3	4 4A- uşoară realcalinizare a pantei produsă de microorganismele negative pentru testul roşului de metil	5
Dezaminarea aminoacizilor (alcalinizarea pantei)	+	+	+	+	+
Fermentarea glucozei	–	+	+	+	+
Fermentarea lactozei	–	–	–	+	+
Fermentarea zaharozei	–	–	–	+	+
Gaz din glucoză	–	–	–	+	– +
Producerea H_2S	–	–	+	–	+
Exemple	*Pseudomonas* *Alcaligenes* *Acinetobacter* Alţi bacili Gram negativi non enterici	*Morganella,* *Providencia,* *Shigella*	*Citrobacter,* *Salmonella,* *Proteus,* *Edwardsiella*	*E. coli,* *Enterobacter,* *Klebsiella*	*Citrobacter* H_2S+, *E. coli* H_2S+ *Salmonella* lactozo+

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



B.

Tub neînsămânțat		
Mobilitate	+	-
LDC	+	-
FAD	-	-
Exemple	*E. coli*	*Shigella flexnerii*



C.

Tub neînsămânțat		
Mobilitate	+	+
Urează	+	-
Indol	-	-
Exemple	*Proteus sp.*	*Salmonella sp.s*

Fig. 322. Sisteme multitest utilizate pentru evidențierea caracterelor biochimice ale microorganismelor: A. Mediu TSI însămânțat cu diferite specii de enterobacterii; B. Mediu MILF (mobilitate, indol, LDC, FAD); C. Mediu MIU (mobilitate, indol, urează).

Tabelul 33.

Surse de neconformitate privind calitatea mediilor de cultură.

Nr. crt.	Neconformitate	Sursa
1.	Agar nesolidificat corespunzător	Depășirea temperaturii de sterilizare, pH scăzut care poate determina hidroliza acidă a agarului, eroare de cântărire a ingredentului, omogenizare insuficientă, calitate necorespunzătoare a agarului.
2.	pH incorect	Sticlărie contaminată chimic, apă impură, supraîncălzirea mediului la sterilizare, pH măsurat la o temperatură neadecvată, deteriorarea mediilor deshidratate.
3.	Culoare necorespunzătoare sau nuanță mai închisă	Apă impură, sticlărie murdară, pH necorespunzător, supraîncălzirea mediului la sterilizare, deteriorarea mediilor deshidratate.
4.	Apariția de precipitate	Supraîncălzirea mediului la sterilizare, apă impură, sticlărie contaminată, deteriorarea mediilor deshidratate.
5.	Inhibarea dezvoltării microorganismelor/creștere redusă/selectivitate redusă	Supraîncălzirea mediului la sterilizare, deteriorarea mediilor deshidratate, sticlărie sau apă contaminate, erori de cântărire a ingredientelor și de omogenizare a acestora.

Controlul coloranților și reactivilor

Laboratorul trebuie să se asigure că toți reactivii (inclusiv soluțiile stoc), mediile, diluenții și alte fluide de suspensie sunt corect etichetate, indicând cu exactitate identitatea produsului, concentrația, condițiile de păstrare, date privind prepararea, date privind valabilitatea/perioada de păstrare recomandată (EA – 4/10).

Testarea (tabelul 34) trebui să fie efectuată:

- de fiecare dată când este preparat un nou lot de soluție de lucru;
- în fiecare săptămână (periodicitatea este critică pentru colorația Ziehl-Neelsen la rece, în timp ce coloranții utilizați în metoda clasică prezintă o stabilitate de câteva luni).

Coloranții și reactivii trebuie aruncați atunci când:

- a fost atinsă data de expirare;
- apar semne vizibile de deteriorare (turbiditate, precipitate, modificări de culoare).

Tabelul 34.

Controlul reactivilor de laborator (după WHO, 2003).

Reactiv de testat	Control pozitiv	Control negativ	Mediu
Bacitracina	*Str. pyogenes (inhibiție)*	*E. faecalis*	Geloză sânge
Catalaza	*S. aureus*	*E. faecalis*	TSA
Coagulaza	*S. aureus*	*S. epidermidis*	TSA
b-Glucuronidază, PGUA- *acid* 4-Nitrofenil-b-D-glucopiranosiduronic	*E. coli*	*K. pneumoniae*	TSA
Colorația Gram	*Staphylococcus* spp	*E. coli*	Frotiu mixt
ONPG – Ortonitrofenil β+D galactopiranozid	*E. coli*	*S. typhimurium*	TSI
Optochin	*Str. Pneumoniae (inhibiție)*	*Str. mitis*	Geloză sânge
Oxidază	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	TSA
Telurit	*E. faecalis*	*Str. agalactiae*	Geloză sânge
Factor V	*H. parainfluenzae (creștere)*	*H. influenzae*	TSA
Factori XV	*H. influenzae (creștere)*		TSA
Ziehl–Neelsen	*M. tuberculosis*		Frotiu mixt

UMF IAȘI BIBLIOTECA CENTRALĂ

Controlul antigenelor de diagnostic şi al antiserurilor:

- se urmează totdeauna instrucţiunile producătorului;
- se păstrează reactivii la temperatura recomandată. Unii reactivi serologici nu tolerează congelarea;
- se evită congelarea şi decongelarea repetate;
- înainte de congelare, antiserul se distribuie în porţiuni mici, suficiente pentru câteva teste;
- pentru aglutinarea bacteriană se folosesc totdeauna culturi proaspete şi pure;
- serurile recoltate de la acelaşi pacient, în timpul fazei acute şi convalescenţei, trebuie testate cu acelaşi lot de reactivi;
- pentru diagnosticul serologic al sifilisului, trebuie utilizate exclusiv proceduri recunoscute la nivel naţional sau internaţional;
- fiecare lot de teste serologice trebuie să includă:
  - ♦ un ser negativ (pentru controlul specificităţii);
  - ♦ un ser slab pozitiv (pentru controlul sensibilităţii);
  - ♦ un ser pozitiv cu titru înalt (pentru controlul tritrului);
- se înregistrează totdeauna valorile titrurilor serului de control.

Controlul testării sensibilităţii la antibiotice (antibiograma)

Testarea sensibilităţii la antibiotice este reglementată de o serie de standarde: CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), DIN (*Deutsches Institut für Normung*), BSAC (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*), SRGA (*Swedish Reference Grup for Antibiotics*), SFM (*Société Française de Microbiologie*), EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, înfiinţat din 1996).

Tulpinile standard de control pentru antibiogramă sunt: *S. aureus* (ATCC 25923; NCTC 6571); *E. coli* (ATCC 25922; NCTC 10418) şi *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853; NCTC 10622), la care se adaugă *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *H. influenzae* (ATCC 49247), *Str. pneumoniae* (ATCC 49619) (CLSI, 2010).

Testele ar trebui să fie efectuate cu cele trei tulpini standard atunci când un nou lot de discuri sau de mediu este pus în folosinţă, respectiv o dată pe săptămână, în paralel cu antibiograma de rutină sau de fiecare dată când se obţin diametre în afara limitelor admise pentru tulpinile de referinţă:

- pentru antibiograma tulpinilor bacteriene fără exigenţe nutritive se utilizează întodeauna mediul Müller-Hinton, care se testează cu tulpina de referinţă *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, şi discuri de SXT şi sulfonamidă;
- corectarea valorii pH (7.2–7.4) este obligatorie, deoarece este esenţială pentru activitatea unor antibiotice;
- inoculul trebuie standardizat prin comparare cu standardul de turbiditate MacFarland 0.5 sau cu ajutorul densitometrului;
- discurile se testează cu ajutorul tulpinilor de referinţă (discurile se păstrează la +4°C, cu excepţia β-lactamicelor care se păstrează la –20°C);
- zonele de inhibiţie trebuie măsurate cu atenţie şi raportate la tabelele cu diametre critice, iar pentru fiecare dintre tulpinile de referinţă, acestea trebuie să se încadreze în limitele prevăzute; citirea zonelor de inhibiţie obţinute pentru tulpinile de referinţă se înregistrează în Registrul de Control Discuri şi nu este admisă mai mult de o eroare la 20 de testări consecutive sau de 3 abateri la 30 de testări consecutive, depăşirea acestei limite necesitând instituirea măsurilor corective şi retestarea unei alte serii de 20 de încercări; după instituirea unor acţiuni corective; pentru testările săptămânale, controlul tulpinilor se efectuează 5 zile consecutiv, pentru fiecare combinaţie microorganism – antibiotic, cele 5 rezultate trebuind să fie cuprinse în limitele admise, iar dacă rezultatele sunt în afara limitelor, pentru acurateţea şi precizia controlului, se reia testarea zilnică timp de 30 zile.

Tulpina de referinţă este definită ca orice microorganism caracterizat la nivel de gen şi specie, clasificat şi descris conform caracteristicilor şi originii (ISO 11133–1:2009) obţinut dintr-o colecţie recunoscută la nivel naţional sau internaţional.

Cultura de referință este termenul general utilizat pentru culturi de referință, stocuri de referință și culturi de lucru.

O cultură stoc de referință este obținută prin pregătirea microorganismului dintr-un tip de cultură de colecție (se păstrează la –70°C în TCB/Trisodium Citrat Glicerol).

Cultura stoc este reprezentată de un set de culturi identice separate, obținute printr-o singură subcultură dintr-o tulpină de referință (ISO 11133–1:2009). Cu 24 de ore înainte de testare, din cultura stoc, printr-un pasaj, se obține **cultura de lucru**, care se înlocuiește lunar prin subcultivare din cultura stoc și se păstrează la 4–8°C în agar înclinat TSB/Geloză Chocolat pentru Haemofili.

Subcultura sau pasajul reprezintă transferul microorganismelor pe un mediu proaspăt, adecvat creșterii. Creșterea unei culturi de referință sau a unei culturi stoc de referință din starea sa de conservare (înghețată sau liofilizată) nu reprezintă o subcultură.

Întreținerea și utilizarea culturilor stoc

Tulpinile de referință se selectează astfel încât un număr minim de tulpini să permită testarea unui număr cât mai mare de caractere morfologice, metabolice și serologice. Acestea pot proveni din diferite produse patologice, dar însoțite obligatoriu de o fișă de identificare corespunzătoare, din colecții oficiale, de la furnizori comerciali, din controale externe de evaluare a calității sau de la laboratoare de referință.

Conservarea pe termen lung se recomandă să fie realizată prin liofilizare sau depozitare la –70°C sau în azot lichid. Alternativa la aceste metode este stocarea în glicerol la –20°C. În scopul conservării, se obține o cultură pură pe un mediu solid adecvat, din care se recoltează o ansă plină care se suspendă în mediul de conservare, reapartizat în criotuburi, în volume de 1–2 ml. Se evită decongelările și congelările succesive, și se transferă după 12–18 luni.

Conservarea se poate realiza și la temperatura camerei, după obținerea culturilor pure pe medii repartizate în pantă (BHI – *broth heart infusion* cu adaos de sânge proaspăt sau tratat termic, pentru conservarea microorganismelor fastidioase), și acoperirea culturii cu ulei de parafină steril sau pe mediu TSA repartizat în tuburi, în coloană dreaptă, însămânțat prin înțepare. Se transferă după 6–12 luni.

Pentru *Neisseria* și pentru streptococi se folosește mediul CTA (*cystine trypticase agar*), repartizat drept în tuburi, însămânțat prin înțepare și păstrat la 35°C pentru *Neisseria* și la temperatura camerei pentru streptococi. Transferul se realizează la fiecare 2 săptămâni pentru *Neisseria* și ~~la~~ o lună pentru streptococi.

Tulpinile de anaerobi se conservă prin aceeași metodă pe mediu *cooked-meat agar*, păstrat la temperatura camerei, iar transferul se recomandă la 2 luni.

Conservarea pe termen scurt

Culturile de lucru pentru testele de zilnice pot fi preparate astfel:

- **Microorganismele cu creștere rapidă/streptococi**
  - se inoculează pe TSA /geloză sânge – repartizat înclinat în tuburi cu dop filetat;
  - se incubează peste noapte la 35°C;
  - se păstrează la frigider și se transferă la fiecare 2 săptămâni.
- **Meningococi și *Haemophilus***
  - se inoculează pe geloză repartizată înclinat sau în plăci;
  - se incubează peste noapte la 35°C;
  - se păstrează la temperatura camerei și se transferă de 2 ori pe săptămână.
- **Gonococci**
  - se inoculează pe geloză repartizată înclinat sau în plăci;
  - se incubează peste noapte și se păstrează la 35°C;
  - se transferă la fiecare 2 zile;
  - tulpina de referință se poate înlocui cu una proaspăt izolată.

Trimiterea probelor la laboratoarele de referință

Se recomandă trimiterea probelor la laboratoare de referință în următoarele situații:

- probe rar solicitate sau teste extrem de specializate (de exemplu, virologie, serodiagnosticul infecțiilor parazitare);
- eșantioane în duplicat pentru verificarea rezultatelor proprii;

- probe care necesită confirmare sau tipizarea unor agenți patogeni de mare importanță pentru sănătatea publică (de exemplu, *Salmonella sp., Shigella sp., V. cholerae, Brucella sp.*, meningococ şi pneumococ);
- laboratoarele de referință ar trebui să fie în măsură să furnizeze culturi de referință pentru controlul calității, seruri standard şi reactivi şi să răspundă nevoilor de instruire;
- în cazul în care nu există un program de control extern de calitate, laboratorul de referință poate fi solicitat să furnizeze culturi şi probe de control laboratoarelor.

Controlul extern al calității (CEC)

Scopurile CEC (numit şi test de proficiență) sunt:

- să ofere o asigurare atât medicilor, cât şi publicului larg privind calitatea unui laborator; să furnizeze analize de bună calitate;
- să evalueze şi să compare performanțele laboratoarelor la scară națională;
- să identifice erorile frecvente;
- să încurajeze utilizarea unor proceduri standardizate şi uniformizate, utilizarea reactivilor standard;
- să ia măsuri administrative (care pot include revocarea licenței de operare) în cazul laboratoarelor care nu corespund;
- să stimuleze punerea în aplicare a programelor interne de control al calității.

Organizarea CEC

Un program de evaluare a calității constă din distribuirea unor eşantioane codificate laboratoarelor participante, care trebuie să trateze şi să manipuleze proba ca pe una de rutină.

Supravegherea trebuie să includă:

- o periodicitate de cel puțin de 4 ori pe an;
- un minim de 3 probe analizate la fiecare participare;
- perioada de raportare trebuie să fie limitată, de exemplu 2 săptămâni de la primirea probelor;
- instrucțiunile şi formularele de raportare trebuie să însoțească probele trimise.

Culturile

Culturile bacteriene care trebuie identificate şi testate pentru sensibilitate la antibiotice pot fi pure sau mixte şi trebuie să corespundă la cel puțin 3 din următoarele situații:

- Specii bacteriene de mare importanță pentru sănătatea publică, dar care sunt rareori izolate în practica de rutină, de exemplu *C. diphtheriae, S. paratyphi A* (*Brucella sp.* şi *S. typhi* nu pot fi utilizate ca probe în schemele CEC, datorită riscului de infecții grave accidentale);
- Biotipuri normale, adesea identificate greşit, de exemplu, *E. coli* H_2S-pozitivă, *E. coli* lactozo-negativă, *Proteus* urează-negativă;
- Specii nou recunoscute ca patogene sau patogeni oportunişti, de exemplu, *Yersinia enterocolitica,*
- *Vibrio parahaemolyticus, Burkholderia cepacia, Pseudomonas sp.*;
- Un amestec de *Shigella sp., Citrobacter sp., E. coli, Klebsiella* sp. pentru testarea competenței unui laborator de a izola microorganismele patogene dintr-o probă contaminată cu microorganisme comensale;
- Un amestec de organisme nepatogene pentru testarea competenței unui laborator de a recunoaşte eşantioanele negative;
- Bacteriile cu profiluri de rezistență deosebite, de exemplu, *S. aureus* meticilino-rezistent (MRSA).

Seruri

Schemele de CEC trebuie să cuprindă teste serologice pentru diagnosticul sifilisului, rubeolei şi brucelozei, infecțiilor streptococice şi febrei tifoide.

Raportarea rezultatelor

După primirea rapoartelor, rezultatele sunt analizate, iar raportul de analiză este trimis laboratoarelor în termen de o lună cu acordarea unui anumit calificativ. Fiecare laborator va avea alocat un cod, astfel încât îşi va putea analiza rezultatele în comparație cu celelalte laboratoare participante, cu respectarea confidențialității.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prelevarea şi transportul produselor patologice

În microbiologia clinică, scopul examinării eşantioanelor de ţesuturi, lichide sau secreţii este de a izola şi de a identifica microroganismele patogene şi de a determina sensibilitatea lor la antibiotice. Faza preanalitică este foarte importantă pentru succesul analizei microbiologice şi depinde de foarte mulţi factori:

- corectitudinea recoltării probei;
- stabilirea gradului de urgenţă a analizei;
- precizarea scopului analizei: pentru diagnostic, alegerea tratamentului, control post-terapeutic, controlul microbiotei comensale etc.;
- preocuparea pentru cercetarea unui anumit agent patogen;
- evaluarea stării fiziologice a bolnavului;
- considerarea noţiunii de sejur tropical;
- cunoaşterea tratamentului anterior, mai ales cu antibiotice;
- evaluarea riscului unei infecţii cu agenţi periculoşi (rezistenţi la antibiotice, înalt epidemiogeni, ca *M. tuberculosis, Brucella sp., Shigella sp.*, meningococ, hepatita virală).

Calitatea eşantioanelor de produs patologic influenţează în mod decisiv calitatea analizei efectuate. Probele trebuie prelevate fără contaminare exterioară, cu minimum posibil de microbiotă comensală şi, obligatoriu, înainte de tratamentul cu antibiotice. Situsul de recoltare poate fi şi poarta de intrare sau calea de ieşire a microorganismelor (fistulă/drenaj). În cazul leziunilor profunde, se recomandă recoltarea probei cât mai aproape de focarul infecţios. Dacă nu este posibilă întreruperea tratamentului cu antibiotice, se recomandă recoltarea probelor în mediu lichid pentru diluarea antibioticului, astfel încât acesta să ajungă la concentraţii subinhibitorii.

Eşantioanele trebuie:

- trimise cât mai repede posibil în laborator (15-30 min. – 2 h), utilizând medii de transport corespunzătoare care să asigure supravieţuirea agentului patogen şi să împiedice proliferarea contaminanţilor;
- etichetate şi introduse în recipiente închise ermetic, la temperaturi de 2-8°C, pentru a evita proliferarea intensă a microbiotei comensale;
- însoţite de date clinice (situl anatomic de recoltare, natura probei, condiţiile de recoltare, contextul fiziopatologic, clinic, epidemiologic, tratament, noţiunea de deficit imunitar);
- în cantitate suficientă pentru realizarea unei analize complete (în cazul leziunilor cronice, există un număr mic de microorganisme care nu pot fi identificate nici pe frotiu şi nici în cultură şi care necesită cantităţi mari de probă – hemocultură, lichide de puncţie, biopsii).

Metodele de prelevare depind de tipul de agenţi patogeni care pot infecta anumite zone şi de tipul de leziune şi suspiciunea diagnosticului etiologic care poate interzice folosirea unor metode invazive, în scopul diminuării riscului de diseminare a infecţiei; de exemplu, recoltarea cu tamponul se face numai pentru probele de pe tegumente şi mucoase, nefiind recomandat pentru alte tipuri de probe din cauza volumului mic de probă recuperat şi a riscului de desicare şi de contaminare. Se recomandă prelevarea a două probe, una pentru microscopie şi una pentru cultură. Trebuie precizat de asemenea, dacă au fost prevăzute probe şi pentru alte examene (citologic, histopatologic, imunologic, biochimic) sau dacă repartizarea lor se face în laborator. Trebuie evitată contaminarea pentru că, prin multiplicare, levurile şi bacteriile comensale pot inhiba bacteriile patogene şi pot fi considerate în mod eronat ca patogeni oportunişti. În mod particular, problema contaminării se pune în cazul hemoculturilor, prelevatelor din tractul respirator, din sfera ORL, oculare, intestinale, genito-urinare, cutanate, subcutanate. S-au depistat metode de prelevare din situri profunde care să evite contactul cu mucoasele colonizate de microbiotă endogenă.

Conservarea probelor trebuie să evite desicarea (mai ales în cazul bacteriilor fragile – *H. influenzae, N. menigitidis, N. gonorrhoeae)* şi multiplicarea.

Sursele de eroare sunt:

- recoltarea probei în timpul tratamentului cu antibiotice, aplicarea antisepticelor locale înainte de recoltarea probei;

- utilizarea unei soluții cu antibiotice pentru recoltarea probei;
- transportul sau stocarea necorespunzătoare a probelor până la analiză;
- utilizarea unui mijloc de transport necorespunzător;
- dificultatea recoltării (care împiedică obținerea unei probe reprezentative pentru procesul infecțios);
- contaminarea probelor;
- dificultatea de a distinge o simplă colonizare de o infecție veritabilă cu patogeni oportuniști.

Condiții în care se poate refuza o probă:

- probă neetichetată corespunzător;
- recipiente deschise, sparte etc.;
- probe vizibil contaminate;
- probe recoltate de mai mult de 2 ore fără să fie conservate corespunzător;
- probe neadecvate pentru analiza prescrisă.

Însămânțarea probei trebuie să se facă imediat, pe medii corespunzătoare (îmbogățite și selective). Mediile vor fi alese în funcție de scopul urmărit care poate fi:

- cercetarea, numărarea și identificarea tututor microorganismelor dintr-un sit anatomic, patogene sau nepatogene; această abordare se recomandă pentru siturile anatomice sterile în mod normal (LCR, lichide de puncție, sânge, țesut).
  - în acest caz se utilizează mediu îmbogățit care să permită creșterea tuturor microorganismelor prezente, de exemplu, în cazul supurațiilor profunde, de tipul abceselor primare sau secundare cu disfuncție hematogenă și cu origine într-un sit superficial (antrax, traumatisme, prezența de catetere, arsuri) sau suprainfecții chirurgicale, localizări viscerale (ficat, plămâni, creier și rinichi) sau seroase (peritonite, pericardite, pleurezii, artrite) însoțite sau nu de bacteriemie;
- abordarea prelevatelor nesterile „invadate" de microorganisme comensale sau saprobionte (piele, cavitate bucală, căi aeriene, tub digestiv, mucoasa genito-urinară, mediu ambiant) presupune utilizarea mediilor de cultură selective, care să favorizeze creșterea și multiplicarea agenților infecțioși, să limiteze multiplicarea microorganismelor comensale prezente în probă.

În unele cazuri, analiza microbiologică are drept scop detectarea portajului cronic sau a persistenței microorganismelor, în vederea prevenirii sau controlului diseminării la alți indivizi receptivi, de pildă, detectarea portajului de *Str. agalactiae* la viitoarele mame pentru prevenirea unei infecții neonatale, detectarea bacteriilor multirezistente la antibiotice cu risc epidemiologic, de exemplu enterobacterii producătoare de β-lactamaze de spectru larg, *S. aureus* rezistent la meticilină, *Str. pneumoniae* rezistent la penicilină și macrolide, *Enterococcus faecium/faecalis* rezistent la vancomicină și aminoglicozide.

Modificarea microbiotei comensale poate fi de asemenea obiectul analizei microbiologice în anumite contexte epidemice bine definite.

15.2. Probe recoltate în scopul analizei microbiologice

O probă este adecvată dacă eșantionul analizat se dovedește reprezentativ pentru statutul microbian prevalent la nivelul zonei anatomice din care se realizează prelevarea (tabelul 35).

SÂNGELE

Analiza bacteriologică a sângelui se numește *hemocultură*. Este indicată pentru diagnosticul septicemiei, bacteriemiei și în orice tablou infecțios sever (endocardite, meningite, pneumopatii, febră la pacienții neutropenici, febră prelungită, orice hipertermie peste 38,5°C).

Momentul prelevării trebuie să fie cât mai timpuriu posibil în cazul unui tablou infecțios sever sau în timpul frisonului. Caracterul intermitent al febrei necesită repetarea hemoculturii.

Situl anatomic este vena plicii cotului, jugulară, fontanelă (la nou-născut) sau lumenul cateterului vascular. Antisepsia este esențială și se asigură cu un antiseptic cu eficacitate imediată (alcool iodat) sau remanentă (clorhexidină).

Volumul recoltat este 5–10 ml la adult sau de 3–5 ml la nou-născut şi copilul mic, iar raportul cantitativ mediu:sânge este de 3%. Se recoltează 2 probe de sânge, una pentru anaerobi şi una pentru aerobi.

URINA

Analiza bacteriologică a urinii se numeşte urocultură, dar pentru că trebuie însoţită de examenul citologic, denumirea completă a analizei este de examen *citobacteriologic* (ECBU). Urina se prelevează în cazul suspiciunii unei infecţii a tractului urinar superior sau inferior. Momentul prelevării este dimineaţa, prima urină, jetul mijlociu, după toaleta riguroasă a tractului genito-urinar, în flacon steril, în volum de 5–10 ml. Însămânţarea trebuie să fie cât mai rapidă, conservarea se poate face câteva ore, la +4°C.

LCR

Recoltarea este indicată în cazul sindroamelor meningeale cu sau fără febră, cefalee, redoarea cefei, fotofobie, hiperreflexie. Principalii agenţi infecţioşi implicaţi sunt reprezentaţi de *Str. pneumoniae*, *N. meningitidis* (la adult), *H. influenzae* (la copil) şi *Str. agalactiae*, *E. coli*, *L. monocytogenes* (la nou-născut). Prelevarea se face prin puncţie lombară, la nivelul L_4-L_5, L_5-S_1, sau puncţie suboccipitală la copil şi nou-născut. Asepsia trebuie să fie ireproşabilă, o contaminare chiar minimă putând cauza erori. Pentru asepsie se utilizează alcool iodat sau antiseptice remanente (clorhexidină). Volumul de lichid recoltat (2–8 ml) este divizat în 3 fracţii care vor fi supuse examenului citologic, bacteriologic şi respectiv biochimic şi virologic.

Se recomandă de asemenea examinarea cu tuş de China pentru diagnosticul *Cryptococcus neoformans* şi evidenţierea antigenelor solubile prin teste rapide, imunologice. Însămânţarea se face pe medii îmbogăţite (geloză-chocolat cu factori de creştere). Recoltarea se face obligatoriu în spital, iar probele se menţin la 30–37°C până la însămânţare.

SECREŢIILE BRONHO-PULMONARE

Analiza secreţiilor se recomandă în caz de suspiciune clinică, steto-acustică sau radiologică de infecţii bronho-pulmonare, infecţii comunitare cu pneumococ, legioneloze, tuberculoze, infecţii nosocomiale, screening-ul portajului de *H. influenzae*, *Str. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *S. aureus*. Metodele de recoltare pot fi: neinvazive (expectoraţia, caz în care trebuie evitată contaminarea orofaringiană), după toaleta buco-dentară şi clătire cu apă distilată sterilă, după tuse spontană sau indusă prin kineziterapie (inhalare de aerosol de NaCl 3%), iar pentru TBC, se recoltează 3 probe, timp de 3 zile consecutiv; invazive, dirijate sub fibroscopie (aspirat bronşic, spălătură bronşică, spălătură bronho-alveolară), puncţie transtraheală, puncţie pulmonară transparietală. Încărcătura microbiană a expectoraţiei este semnificativă dacă depăşeşte valoarea de 10^7 UFC/ml. În cazul utilizării unei mètode invazive, analiza este semnificativă dacă încărcătura microbiană este mai mare de 10^3 UFC/ml.

MATERIILE FECALE

Examenul bacteriologic al materiilor fecale se numeşte coprocultură şi este indicat pentru diagnosticul etiologic al diareei acute infecţioase, gastroenteritelor izolate sau colective, portajului intestinal de *Salmonela* sau de bacterii multirezistente. Momentul prelevării: în timpul tulburărilor digestive, dacă există, fără o pregătire specială (nu se indică utilizarea de supozitoare sau clisma). Spre deosebire de examenul coproparazitologic, coprocultura nu se repetă (excepţie în diagnosticul portajului de bacterii multirezistente, controlul eficienţei tratamentului). Când emisia spontană nu este posibilă, se recomandă recoltarea cu ajutorul tamponului rectal. Asepsia nu este necesară, deoarece materiile fecale conţin 10^9–10^{11} bacterii comensale/ml sau /g. Însămânţarea se face imediat, multiplicarea bacteriilor comensale deteminând apariţia fenomenelor de competiţie şi acidifierea mediului; când acest lucru nu este posibil, materiile fecale sunt conservate în tampon fosfat, glicerol sau păstrare la +4°C. În cazul scaunelor dizenterice se recomandă recoltarea materialului mucosangvinolent.

SECREŢII PURULENTE ŞI SEROZITĂŢI

Analiza bacteriologică este indicată pentru a confirma şi documenta o infecţie înainte de instituirea unui tratament sau în cazul ineficienţei unui tratament administrat empiric. Metodele de prelevare sunt: *superficiale* – când situsul infecţiei este direct accesibil şi se realizează cu ajutorul unui tampon care se descarcă imediat pe mediu şi *profunde* –care necesită o puncţie folosind o pipetă sau seringă. Antisepsia trebuie să fie riguroasă în cazul abceselor închise; pentru abcesele cu fistulă sau plagă superficială infectată (arsuri, escare) se foloseşte o soluţie nebactericidă. Transportul se face evitând desicarea şi în condiţii de anaerobioză. Însămânţarea se face imediat, în 30 minute de la recoltare, iar ca mediu de transport se poate utiliza mediul tip Stuart.

PRELEVATELE DIN SFERA ORL

Recoltarea este indicată pentru diagnosticul etiologic al anginelor (cu streptococi β-hemolitici grup A, asocierea fuso-spirochetiană caracteristică anginei Vincent, *C. diphtheriae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*), otite, portaj de bacterii multirezistente. Recoltarea se face cu tamponul din: gât (exsudat faringian) (tamponarea amigdalelor, palatului, lojelor amigdaliene, fără a atinge limba), nas (exsudat nazal pentru diagnostic de *B. pertussis*), sinusuri (din meatul mijlociu al sinusurilor anterioare sau puncționarea sinusurilor maxilare), urechea medie (puncție, tampon), urechea externă (tampon sub speculum). Recoltarea se face de obicei în laborator, cu două tampoane (unul utilizat pentru realizarea unui frotiu, iar celălalt pentru însămânțarea imediată pe mediu de cultură).

SECREȚII OCULARE

În mod normal mucoasa conjunctivală este sterilă, dar examenul bacteriologic se realizează în mod sistematic preoperator sau pentru diagnosticul etiologic al unei conjunctivite. Este interzisă orice toaletă locală înainte de prelevare, care se efectuează dimineața, din unghiul intern al ochiului, cu ajutorul tamponului cu care se colectează secrețiile acumulate în cursul nopții.

PRELEVATE DIN SFERA GENITALĂ

Se recomandă în cazul unor infecții ale organelor genitale însoțite sau nu de secreții purulente, sau în cazul prezenței unor ulcerații genitale.

La bărbați se recoltează picătura matinală (diagnostic de *N. gonorrhoeae*) sau se realizează un grataj al mucoasei uretrale cu ajutorul unei chiurete sau tampon rigid spiralat care să permită recoltarea celulelor epiteliale pentru diagnostic de *Mycoplasma* sau *Chlamydia*.

La femei, secrețiile vaginale se recoltează cu ajutorul unei pipete sterile înainte de orice toaletă locală, tratament local, după abstinență sexuală de 3 zile, iar în cazul ulcerațiilor genitale acestea se curăță cu ser fiziologic steril, se presează ușor marginile ulcerației pentru a provoca exsudarea și apoi se realizează recoltarea lichidului cu ajutorul tamponului. Însămânțarea trebuie să fie imediată, iar pentru diagnosticul infecțiilor cu bacterii intracelulare probele pot fi conservate la +4°C, în mediu adecvat de transport.

PRELEVATE TEGUMENTARE

Recoltarea este indicată pentru supravegherea colonizării bacteriene la arși, biopsia cutanată permițând și analiza în profunzime a microbiotei sau pentru determinarea portajului de bacterii multirezistente. Prelevarea se face cu ajutorul tamponului de la nivelul pliurilor axilare și inghinale, perineului, periombilical, periungular, interdigital, palmar.

Având în vedere că numeroase prelevate sunt inutile sau neexplorabile, înainte de realizarea recoltării unui produs patologic în scopul unei analize microbiologice, trebuie să ne asigurăm că analiza este necesară, că ajută la îmbunătățirea tratamentului, trebuie să știm ce microorganisme căutăm (bacterii, fungi, microorganisme greu cultivabile), ce material și ce tehnică se aplică și dacă este necesară și o analiză cantitativă.

Tabelul 35.

Infecții bacteriene localizate: agenți etiologici, probe patologice și diagnostic (Brooks și colab., 2007)

Infecție	Proba patologică	Agentul etiologic	Examen microscopic	Medii de cultură
Celulită	Biopsie de la marginea leziunii eritematoase	Streptococi, de grup A *S. aureus*	Coci Gram pozitivi	Geloză sânge.
Impetigo	Tampon	Streptococi, de grup A *S. aureus, C. diphtheriae*		
Ulcere cutanate	Biopsie Aspirat tisular	Microbiotă mixtă	Microbiotă mixtă	Geloză sange, MacConkey, EMB; medii pentru anaerobi.
Meningită	CSF	*N. meningitidis*	Diplococi Gram negativi, intracelulari	Geloză chocolat, geloză sânge.
		Haemophilus influenzae	Cocobacili Gram negativi, de dimensiuni mici	Geloză chocolat
		Streptococcus pneumoniae	Diplococi Gram pozitivi	Geloză sânge
		Streptococi de grup B	Coci Gram pozitivi în lanțuri	Geloză sânge
		Escherichia coli; alte *Enterobacteriaceae.*	Bacili Gram negativi.	Geloză sânge
		L. monocytogenes	Bacili Gram pozitivi.	Geloză sânge, hemoliză.

BCU IAȘI

Abces cerebral	Puroi recoltat şi transportat în condiţii de anaerobioză	Infecţie mixtă; anaerobi şi coci aerobi Gram pozitivi sau coci/bacilli Gram negativi sau coci aerobi Gram pozitivi.	Coci Gram pozitivi sau microbiotă mixtă.	Geloză sânge, geloză chocolat; medii pentru anaerobi.
Abces perioral	Puroi	Microbiotă oro-faringiană, rar actinomicoză.	Microbiotă mixtă	Geloză sange, geloză chocolat; medii pentru anaerobi MacConkey sau EMB.
Faringită	Tampon	Streptococi de grup A	Nu se recomandă	Geloză sânge sau mediu selectiv
		C. diphtheriae	Nu se recomandă	Mediu Loeffler sau Pai', apoi cisteină telurit sau mediu Tinsdale.
Tuse convulsivă (pertusis)	Tampon	*B. pertussis*	Nu se recomandă	Agar Regan-Lowe.
Epiglotită	Tampon	*H. influenzae*	Nu se recomandă	Geloză chocolat sau sânge.
Pneumonie	Spută	*Str. pneumoniae*	Frecvente PMN, coci Gram pozitivi în perechi sau lanţuri, umflarea capsulei.	Geloză chocolat sau sânge, MacConkey sau EMB.
		S aureus – rar	Coci Gram pozitivi în perechi, tetrade, ciorchine.	Geloză chocolat sau sânge, MacConkey sau EMB.
		Enterobacteriaceae şi alţi bacili Gram negativi.	Bacili Gram negativi.	Geloză sânge, MacConkey sau EMB.
		Etiologie mixtă aero-anaerobă.	Microbiotă respiratorie mixtă, rareori PMN.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Emfizem pulmonar	Puroi	Aceeaşi ca în pneumonie sau microbiotă mixtă.	Microbiotă respiratorie mixtă.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Abces hepatic	Puroi	*E. coli; Bacteroides fragilis;* microbiotă mixtă aerobă sau anaerobă, *Entamoeba histolytica*	Bacili Gram negativi; microbiotă mixtă.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Colecistită	Bilă	Bacili enterici aerobi Gram negativi, *B fragilis.*	Bacili Gram negativi.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Abces abdominal sau perirectal	Puroi	Microbiotă intestinală	Microbiotă mixtă, uneori > 5 specii.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Febră enterică, tifoidă	Sânge, fecale, urină,	*Salmonella* typhi	Nu se recomandă.	MacConkey, Hektoen, agar cu sulfit de bismut;
Enterite, enterocolite, diaree bacteriană, gastroenterite.	Fecale	*Salmonella* sp., altele decât *S. typhi.*	PMN	MacConkey, Hektoen, agar cu sulfit de bismut.
		Shigella sp.	Coloraţia Gram sau cu albastru de metilen poate evidenţia PMN.	MacConkey, Hektoen, agar cu sulfit de bismut.
		Campylobacter jejuni	Bacili Gram negativi în formă de "aripi de pasăre", PMN.	Campy BAP incubat la 42°C.
		Vibrio cholerae	Nu se recomandă.	Tiosulfat citrat bilă sucroză (TCBS) (colonii galbene); Apă peptonată cu taurocolat.
		Alţi vibrioni	Nu se recomandă.	Similar ca pentru *V cholerae*
		Yersinia enterocolitica	Nu se recomandă.	MacConkey/CIN (cefsulodin-Irgasan-novobiocină) incubate la 25°C, opţional îmbogăţire la 4°C.
Colită hemoragică sau SHU	Fecale	*E coli* O157:H7	Nu se recomandă.	MacConkey cu sorbitol (colonii sorbitol negative).
Infecţii de tract urinar	Urină	*E coli; Enterobacteriaceae;* alţi bacili Gram negativi.	Bacili Gram negativi pe frotiu din urină necentrifugată 10^5 UFC/mL.	Blood agar; MacConkey sau EMB.
Uretrită/cervicită	Tampon	*Neisseria gonorrhoeae*	Diplococi Gram negativi asociaţi cu PMN.	Thayer-Martin modificat.
		Chl. trachomatis	PMN.	Celule McCoy tratate cu cicloheximidă.
Ulcere genitale	Tampon	*Haemophilus ducreyi* (chancroid)	Microbiotă mixtă.	Geloză chocolat cu IsoVitaleX şi vancomicină.
		Treponema pallidum (sifilis)	Microscop cu fond întenecat sau cu fluorescenţă.	
	Aspirat ganglionar	*Chl. trachomatis*	PMN.	Celule McCoy tratate cu cicloheximidă.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Boala inflamatorie pelvică	Tampon cervical	*N. gonorrhoeae*	PMN associate cu diplococi Gram negativi diplococci; microbiotă mixtă	Thayer-Martin modificat; PCR
		Chl. trachomatis	PCR	Celule McCoy tratate cu cicloheximidă
	Aspirat de col uterin	*N. gonorrhoeae*	Diplococi Gram negativi asociaţi cu PMN.	Mediu Thayer-Martin modificat
		Chl. trachomatis	PMN	Celule McCoy tratate cu ciloheximidă.
		Microbiotă mixtă	Microbiotă mixtă.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Artrită	Aspirat articular, sânge,	*S. aureus*	Coci Gram pozitivi în perechi, tetrade, grămezi.	Geloză sânge, geloză chocolat.
		N. gonorrhoeae	Diplococi Gram negativi asociaţi cu PMN.	Mediu Thayer-Martin modificat.
		Alte specii	Tipuri morfologice varibile, în funcţie de etiologie.	Geloză sânge, geloză chocolat mediu pentru anaerobi.
Osteomielită	Puroi sau os	Multiplă; frecvent *S. aureus*	Tipuri morfologice varibile, în funcţie de etiologie.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.

15.3. Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator

Infecţiile tractului respirator sunt clasificate în infecţii ale etajelor superioare (rinite, faringite sau angine, sinuzite, otite, laringite) şi inferioare (traheite, bronşite, pneumonii, bronho-pneumonii, pleurezii).

Dintre ITRS cele mai frecvente sunt faringitele. În acest caz pentru diagnostic este necesară recoltarea exsudatului faringian (etimologia pledează pentru forma *exsudat*: lb. latină, *exsudatio -onis*, ex = în afară, *sudare* = a transpira. Forma folosită, *exudat*, este un exemplu de neologism deformat, impropriu folosit).

Recoltarea exsudatului faringian se recomandă în cazul anginei acute, recidivante, ulcero-necrotice, candidozei oro-faringiene şi al unor infecţii cu transmitere sexuală.

Acest produs nu prezintă interes în cazul flegmoanelor amigdaliene cu colecţii închise, epiglotitei, produsă în principal de *H. influenzae* (diagnosticat prin hemocultură), în care recoltarea din gât poate fi periculoasă, sindromului anginos din infarctul pulmonar Lemierre, generat de *Fusobacterium necrophorum* (diagnosticat din hemocultură sau puncţie pleurală), ulceraţiilor oro-faringiene (prelevarea din leziune nu este recomandată datorită prezenţei treponemelor comensale, dificil de delimitat de *T. pallidum* la microscopul cu fond negru şi cu sensibilitate scăzută pentru detectarea prin metoda IF).

70% din cazurile de faringite acute sunt de natură virală, iar *Str. pyogenes* (streptococul β-hemolitic de grup A) este principalul agent etiologic al anginei bacteriene acute, alături de streptococii de grup B, C şi G. Cultivarea rămâne metoda de referinţă pentru evidenţierea acestei bacterii, cu o sensibilitate de 90–95% faţă de 80–90% în cazul truselor de identificare rapidă.

Tabelul 36.

Agenţii patogeni, izolaţi din exsudatul farinagian, semnificativi în diferite contexte clinice (adaptat după REMIC 2008, WHO, 2003, Buiuc şi Neguţ, 2009).

Contextul clinic	Agenţi patogeni
Angina acută	*Str. pyogenes* (grup A) Streptococci β-hemolitici de grup B, C şi G
Angina eritemoatoasă (insoţită de o iritaţie cutanată)	*Str. pyogenes* şi *Arcanobacterium haemolyticum* (mai ales la adultul tânăr)
Angina recidivantă	Suplimentar *H. influenzae, S. aureus, Moraxella (Branhamella) catarrhalis*
Angina ulcero-necrotică	Asociaţia fusospirilară caracteristică anginei Vincent
Angina diferică (cu membrane false)	*C. diphtheriae* (Begg, 1994)
Candidoza orofaringiană	*C. albicans*
Bilanţul iniţial al unei boli cu transmitere sexuală Faringita gonoreică	*N. gonorrhoeae*
Pneumonie interstiţială	*Chl. pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae* (mai ales la copii)
Flegmonul amigdalian Amigdalită cu microabcese	*S. pyogenes, H. influenzae, S. aureus*, anaerobi (*Fusobacterium* spp., *B. fragilis, Peptostreptococcus* spp.).

Patogenii semnificativi (tabelul 36) trebuie diferențiați de speciile ce alcătuiesc microbiota comensală de la nivelul tractului respirator superior, care nu trebuie identificate sau raportate, reprezentate de: streptococi viridans (α-hemolitici), tulpini de *Neisseria* spp. nepatogene, *Moraxella* (anterior *Branhamella*) *catarrhalis* (considerată patogenă doar în anumite cazuri), stafilococi (*S. aureus*, *S. epidermidis*), difteromorfi, *Haemophilus* spp., levuri (*Candida* spp.) în cantitate redusă, diferite tulpini strict anaerobe, spirochete și forme filamentoase, *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* spp., etc.) și bacili Gram negativi nonfermentativi (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp.) la pacienții vârstnici, malnutriți și imunodeprimați, la care pot fi de asemenea identificate în cantitate mare *S. aureus*, *Candida* spp. sau alte specii de fungi (REMIC; 2008, Buiuc și Neguț, 2009). În acest ultim caz, chiar dacă aceste specii nu produc faringită, decât pe fondul unei granulocitopenii, totuși trebuie raportate clinicianului, datorită posibilității apariției unei ITRI.

Recoltarea exsudatului nazal este recomandată pentru diagnosticul rinitelor sau sinuzitelor. Rinitele sunt în majoritate virale sau nemicrobiene (alergice, mecanice, medicamentoase etc.). Rinita microbiană constă în inflamația mucoaselor nazale cu edeme și secreții, produsă de bacterii (stafilococi, streptococi, *Enterobacteriacee*, bacilul piocianic) și levuri din genul *Candida*. Examenul direct poate orienta asupra tipului de rinită. Sinuzita este inflamația mucoasei sinusale, cel mai adesea de natură bacteriană (*Str. pneumoniae, Str. pyogenes, H. influenzae,* mai rar *neisserii, Moraxella catarrhalis, S. aureus* și bacili Gram negativi). În sinuzitele cronice apar infecții mixte aero-anaerobe. Recoltarea se realizează de către medicul specialist prin puncționarea sinusurilor.

Recoltarea exsudatului nazal sau faringian poate servi, de asemenea, pentru detectarea purtătorilor de *S. aureus* meticilino-rezistent (MRSA), *N. meningitidis*, *Str. pyogenes* și *C. diphtheriae*.

În cazul investigării portajului de MRSA se efectuează testarea sensibilității doar pentru penicilină (identificarea tulpinilor producătoare de penicilinază) și cefoxitin sau oxacilină (identificarea tulpinilor meticilino-rezistente).

Fig. 323. De la stânga la dreapta: tulpină de *S. aureus* sensibilă la penicilină (P) și meticilină (determinată cu ajutorul discului de cefoxitin – FOX), R la P, MRSA și R la P, MRSA.

Prelevarea și transportul probelor:

- Se realizează înainte de orice tratament local sau general cu antibiotice.
- Prelevarea se realizează cu apăsătorul de limbă, cu ajutorul tamponului, de pe amigdale (sau amigdală în cazul amigdalitei unilaterale), de pe vălul palatin și partea posterioară a faringelui (fig. 324, 325).
  - În cazul existenței unei ulcerații sau a unui exsudat prelevarea se face direct de la nivelul leziunilor;
  - În cazul anginei difterice sunt prelevate și membranele false;
  - Pentru *Candida* recoltarea se face de pe mucoasa linguală, a palatului și a feței interne a obrajilor.
- În cazul în care se recomandă realizarea unui frotiu (leziuni ulcerative) se folosesc două tampoane: unul pentru etalarea pe lamă, iar al doilea pentru însămânțare.
- Dacă însămânțarea nu se realizează în maxim 2 ore, se folosește un mediu de transport tip Stuart sau Amies.
- Recoltarea exsudatului bazal se face cu câte un tampon înmuiat în ser fiziologic pentru fiecare fosă nazală.

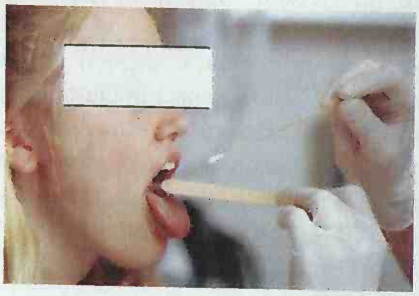


Fig. 324. Recoltarea exsudatului faringian.

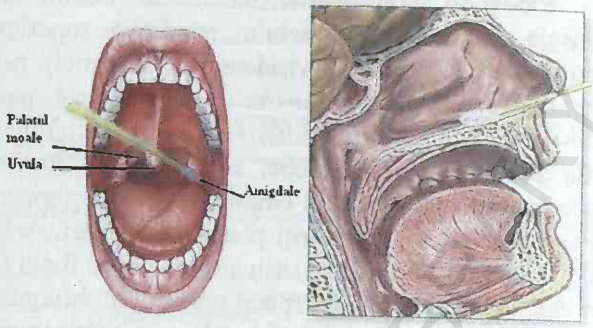


Fig . 325. Recoltarea exsudatului nazal.

Examenul microscopic al frotiului colorat Gram, realizat NUMAI LA CEREREA CLINICIANULUI are drept scop:

- Semnalizarea prezenței sau absenței leucocitelor, indicatori ai inflamației;
- Evidențierea asociației fuso-spirochetale caracteristică anginei Vincent (fig. 326);
- Eventualul sumar al microbiotei (calitativ şi cantitativ);
- Evidențierea levurilor.

Fig. 326. Frotiu realizat din ulcerație faringiană în angina Vincent. Săgețile indică prezența spirochetelor.

Însămânțarea tamponului se realizează pe:

- geloză sânge sau geloză sânge cu inhibitori, incubată în atmosferă de 10% CO_2 sau anaerobioză, pentru o mai bună evidențiere a β-hemolizei produsă de streptococi. Pentru *Arcanobacterium haemolyticum* (bacil Gram pozitiv corineform) incubarea trebuie prelungită cu 24–48 ore;
- geloză cu sânge tratat termic sau geloză chocolat îmbogățită cu factori de creştere pentru *H. influenzae* (*M. catarrhalis* se dezvoltă mai bine pe acest mediu decât pe cele uzuale), incubată în atmosferă de 10% CO_2 cu sau fără bacitracină;
- geloză chocolat îmbogățită cu factori de creştere şi inhibitori (tip VCAT) pentru *N. gonorrhoeae;*
- mediu Loeffler sau Tinsdale modificat pentru *C. diphteriae*;
- mediu Sabouraud cu cloramfenicol sau gentamicină incubat la 30°C pentru *C. albicans*.

Pentru o bună evidențiere a β-hemolizei, mediul de bază nu trebuie să conțină glucoză, sau concentrația trebuie să fie redusă, deoarece acidifierea mediului rezultată în urma fermentării glucozei blochează producerea hemolizinelor (WHO; 2003).

Grosimea stratului de mediu trebuie să fie de 4–5 mm, iar sângele poate proveni de la diferite specii, inclusiv de la donori umani, însă sângele de berbec este de preferat, deoarece poate evidenția activitatea hemolitică a tulpinilor comensale de *Haemophilus sp.,* dar nu şi hemoliza produsă de varianta *zymogenes* a speciei *Enterococcus faecalis* (WHO; 2003). Recunoaşterea coloniilor β-hemolitice poate fi îmbunătățită prin înțeparea mediului în profunzime cu ansa în timpul însămânțării sau prin adăugarea unui disc de cotrimoxazol (biseptol) la care *S. pyogenes* este rezistent şi a unui disc de bacitracină de

concentrație joasă direct pe striul de însămânțare a tamponului. Coloniile de *Str. pyogenes* sunt mici (0.5–2 mm), înconjurate de o zonă clară de β-hemoliză și apar după 18–24 de ore (fig. 327).

Identificarea de certitudine se realizează prin testarea sensibilității la bacitracină de 0.02–0.05 IU (apariția oricărei zone de inhibiție a creșterii în jurul discului). Pentru identificare nu se folosesc discuri de 10U.

Confirmarea serologică se realizează prin aglutinare. Raportarea este semicantitativă (colonii rare, +, + +, sau + + +). La purtători, numărul de colonii este sub 20, în timp ce la pacienții cu faringită sunt foarte frecvente. Coloniile mici care aglutinează cu serul anti-A nu sunt considerate ca aparținînd speciei *Str. pyogenes* și nu sunt asociate cu infecții grave.

Fig. 327. Cultură de *Streptococcus pyogenes* pe geloză sânge.

Fig. 328. Cultură de *H. influenzae* pe geloză chocolat și satelitism pe geloză sânge, în proximitatea culturii de *S. aureus.*

Pentru streptococii β-hemolitici nu se recomandă antibiograma. Tratamentul de elecție în cazul infecției cu *Str. pyogenes,* indiferent de cantitatea în care se regăsește, este benzilpenicilina sau eritromicina. În cazul *H. influenzae* și *M. catarrhalis* se recomandă detecția rapidă a β-lactamazelor.

15.4. Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator inferior

Infecțiile tractului respirator inferior (ITRI) sunt localizate la nivelul traheei, bronhiilor, sau în țesutul pulmonar (traheită, bronșită, abces pulmonar, pneumonie). Uneori, în pneumonie, sunt afectate și membranele adiacente rezultând pleurezia, însoțită uneori de acumulare de lichid în cavitatea pleurală (efuziune pleurală). O formă specială a ITRI este tuberculoza pulmonară. Mulți pacienți cu ITRI prezintă tuse însoțită de secreții purulente, sputa fiind în general verde sau gălbuie. Alteori, secrețiile sunt în cantitate mică sau absente, ca în cazul legionelozei (*Legionella pneumophila*), pneumoniei produse de *Mycoplasma pneumoniae* ("pneumonie atipică primară") și *Chl. pneumoniae.* Aceste etiologii necesită pentru confirmare tehnici speciale (serologie și izolare pe medii speciale).

La pacienții cu bronșită acută (consecutivă, de regulă, unei infecții virale acute), nu se recomandă analiza microbiologică a sputei decât în cazurile în care nu se observă semne clinice de ameliorare.

În cazurile de bronșită cronică de lungă durată, din sputa care este de obicei gri, cu aspect mucoid se izolează patogenii respiratori clasici (*H. influenzae, Str. pneumoniae,* sau mai rar, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis).*

În abcesele pulmonare, rezultate după inhalarea corpilor străini, a conținutului gastric sau a secrețiilor tractului respirator superior (pneumonie de aspirație), se poate analiza sputa sau puroiul de abces. În acest caz, pot fi izolate bacterii anaerobe*: Prevotella melaninogenica (*fostă *Bacteroides melaninogenicus)* și *Peptostreptococcus spp.*

Pneumonia acută lobară afectează de obicei un singur lob pulmonar și este aproape totdeauna cauzată de *Str. pneumoniae*, și mai rar, de *Klebsiella pneumoniae.*

Bronhopneumonia (asociată cu apariția zonelor de infiltrație și de inflamație în unul sau în ambii plămâni) este produsă de virusuri sau bacterii. Etiologia bacteriană este reprezentată de *Str. pneumoniae, H. influenzae, S. aureus, E. coli, K. pneumoniae* și *Ps. aeruginosa.* În caz de pleurezie, lichidul pleural trebuie examinat microscopic și cultivat.

Sputa pacienților cu tuberculoză pulmonară nu este de obicei foarte purulentă, dar trebuie etalată pe frotiu pentru coloraţia Ziehl-Neelsen. Dacă frotiul este pozitiv pentru BAAR, sputa este decontaminată şi cultivată pe mediu Lowenstein-Jensen.

Procedurile bacteriologice pentru diagnosticul infecţiilor piogenice respiratorii (bronşita şi pneumonia), sunt fundamental diferite de cele pentru tuberculoză, motiv pentru care vor fi tratate separat.

Recoltarea sputei

Se realizează după o tuse forţată, într-un recipient steril cu gură largă, după clătirea gurii cu apă distilată, petru a evita contaminarea cu bacterii din microbiota orofaringelui. O probă de "spută" constând din salivă şi resturi alimentare nu trebuie examinată. Recipientul închis etanş se trimite imediat la laborator şi se examinează fără întârziere pentru a evita multiplicarea bacteriilor comensale prezente în probă.

Evaluarea macroscopică

Aspectul macroscopic al sputei trebuie înregistrat, iar posibilele descrieri includ:

- **Aspecte revelatoare pentru infecţie pulmonară**: purulent/verde, purulent/galben, mucopurulent / cu urme de sânge / cu flocoane verzi;
- **Spute cu aspecte necorespunzătoare pentru examenul bacteriologic, care nu trebuie examinate în infecţiile non-tuberculoase:** gri, mucoid / gri, lipsit de conţinut / alb, mucoid / alb, lipsit de conţinut / alb, mucoid, cu resturi alimentare / apos (salivă) / apos, cu resturi alimentare.

Examinarea microscopică

Din sputele corespunzătoare macroscopic se realizează frotiuri colorate Gram, din zonele semnificative (ex. porţiuni purulente).

Dacă pe frotiul colorat Gram se observă celule scuamoase, celule epiteliale, frecvent acoperite cu bacterii aderente, acest aspect este caracteristic pentru secreţiile orofaringiene şi proba nu trebuie cultivată. Pentru cultivare, se respinge orice produs care conţine mai puţin de 10 neutrofile polimorfonucleare pentru o celulă epitelială.

În schimb frotiul realizat din spute purulente poate orienta rapid diagnosticul ITRI, evidenţiind:

- diplococi Gram pozitivi capsulaţi (*S. pneumoniae*);
- coccobacili mici Gram negativi (*H. influenzae*);
- diplococi Gram negativi, intracelulari şi extracelulari (*Moraxella catarrhalis*);
- coci Gram pozitivi în ciorchine (*S. aureus*);
- bacili Gram negativi (*Enterobacteriaceae* sau *Pseudomonas* spp.);
- levuri Gram pozitive şi/sau micelii (*Candida* spp.).

Cultivarea sputei

Pentru cultivare se selectează porţiunile semnificative care se însămânţează pe:

- geloză sânge, cu un striu de *S. aureus* pentru a facilita creşterea coloniilor satelite de *H. influenzae* şi cu un disc de optochin plasat în mijlocul striului de însămânţare pentru evidenţierea *Str. pneumoniae*;
- geloză chocolat;
- agar MacConkey;
- agar manitol (în cazul suspiciunii de *S. aureus*);
- agar Sabouraud (în cazul suspiciunii de *Candida* sp.).

Geloza sânge şi chocolat se incubează la 36°C în atmosferă de CO_2 (exsicator), iar placa de MacConkey în aerobioză.

Plăcile se examinează iniţial la 18 ore, apoi se reincubează pentru alte 24 de ore, dacă se constată creştere microbiană insuficientă.

Pe mediile de cultură pot fi observate:

- colonii plate, transparente, cu centrul concav şi zone de α-hemoliză, precum şi o zonă de inhibiţie a creşterii în jurul discului optochin (S. *pneumoniae*);
- colonii fine, transparente, convexe, cu creştere satelită în vecinătatea striului de *S. aureus*, nehemolitice şi colonii mult mai mari pe geloză chocolat (*H. influenzae*, confirmat prin evidenţierea dependenţei de factorii X şi V);

- colonii uscate, friabile, alb-gri, intens oxidază pozitive (*M. catarrhalis*);
- colonii mijlocii, cu pigment auriu (*S. aureus*, se recomandă efectuarea testului coagulazei, şi fermentaţiei manitolului);
- creşterea pe MacConkey indică prezenţa unor tulpini de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. sau *Acinetobacter* spp;
- colonii albicioase, rotunde, mate (*C. albicans*).

Raportarea creşterii este semicantitativă:
(+) = câteva colonii;
+ = creştere uşoară;
+ + = creştere moderată;
+ + + = creştere abundentă.

Dacă numărul de colonii este redus, acestea provin din microbiota normală comensală a tractului respirator sau sunt rezultatul colonizării, nefiind relevante pentru managementul pacientului, motiv pentru care trebuie să fie raportate ca microbiotă colonizatoare sau deloc.

15.5. Examenul citobacteriologic al urinii (ECU)

Urina este produsul biologic analizat cu cea mai mare frecvenţă în laboratorul de microbiologie. Cele mai frecvente infecţii ale tractului urinar (ITU) sunt cele ale vezicii urinare (cistite) şi ale uretrei. Din aceste situsuri, infecţia poate evolua ascendent la nivelul ureterelor (ureterită) şi ulterior, la nivelul rinichilor (pielonefrite). Femeile sunt mai predispuse la ITU decât bărbaţii. La ambele sexe infecţia poate fi asimptomatică, acută sau cronică. ITU acută este mai frecventă la femeile de diferite vârste şi tratată în ambulatoriu. ITU cronică este prezentă atît la bărbaţi, cât şi la femei de diferite vârste, fiind asociată de obicei cu o afecţiune primară (pielonefrita, prostatita, anomalii congenitale ale tractului genito-urinar) şi necesită internare (WHO, 2003). Indiferent de tipul ITU, sunt implicate bacteriile enterice, în special *E. coli* alături de *Proteus mirabilis* şi mai rar *P. vulgaris, Serratia marcescens, K. pneumoniae, Enterobacter aerogenes, enterococi, Ps. aeruginosa, stafilococi coagulază-negativi, S. aureus, S. saprophyticus* (la femeile tinere), iar la pacienţii imunodeprimaţi, *Corynebacterium urealyticum* (vechiul grup D2), *Candida* spp. (C. *albicans* şi C. *glabrata), Oligella urethralis, Aerococcus urinae* şi *Lactobacillus* spp. (REMIC, 2008).

Prezenţa a două sau mai multe tipuri de microorganisme diferite într-o urocultură semnifică recoltarea / manipularea necorespunzătoare a probei şi necesită repetarea recoltării, cu excepţia pacienţilor cateterizaţi unde pot fi adesea obţinute culturi polimicrobiene din urină.

Pentru realizarea corectă a diagnosticului citobacteriologic al urinii este necesară respectarea următoarelor condiţii:

- recoltarea aseptică a urinii şi transportul corect la laborator;
- cunoaşterea principalelor specii microbiene care produc ITU;
- cunoaşterea etapelor ECU;
- interpretarea rezultatelor;
- efectuarea unei antibiograme corecte.

Recoltarea se realizează diferit, în funcţie de circumstanţele anatomo-clinice: caz general, pacient sondat, sugar, analiza pentru micobacterii, ureterostomie neo-vezicală (Bricker):

- în general, se recoltează prima urină de dimineaţă, după igienizarea mâinilor şi toaleta locală cu săpun sau antiseptic. Se elimină primul jet (20 ml) de urină apoi se recoltează proba într-un flacon steril, fără a se atinge partea superioară a recipientului. Flaconul este închis ermetic, etichetat şi dus imediat la laborator însoţit de fişa şi ora recoltării. Dacă acest lucru nu este posibil, proba se poate menţine câteva ore la +4°C;
- pacient cateterizat: puncţionarea pungii de colectare a urinii dezinfectată în prealabil, cu o seringă sau cu un sistem de aspiraţie cu vid şi transferul urinii recoltate într-un flacon steril;
- sugar: este folosit un colector steril specific, de unică utilizare care poate fi instalat pentru maximum o oră. Dacă în acest interval copilul nu a urinat, dispozitivul este înlocuit cu unul nou. Urina poate fi recoltată şi "din zbor", într-un flacon steril, în cursul micţiunii spontane;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- identificarea micobacteriilor: acest examen trebuie efectuat din toată cantitatea de urină colectată la prima micțiune de dimineață, după restricție hidrică, timp de trei zile.

Circumstanțe particulare:

- urina din primul jet (după un eventual masaj prostatic) este analizată în cazul suspiciunii de infecție uretrală sau prostatică cu *Mycoplasma* sau *Chl. trachomatis*;
- prelevarea urinii direct din vezică prin puncție suprapubiană;
- prelevarea din cateter ureteral permite obținerea probelor separate de urină din cei doi rinichi.

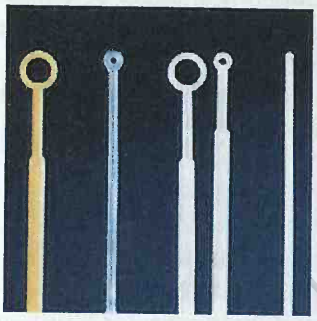
Examenul citologic al urinii este realizat prin **metode cantitative**, pe sedimentul urinar obținut prin centrifugarea probei de urină timp de 5 minute la 1800 rpm, cu ajutorul unei camere de numărare a celulelor (în condiții fiziologice urina conține sub 10.000 leucocite și 5.000 hematii per ml; în cazul infecției urinare procesul inflamator se traduce cel mai adesea prin prezența a peste 50.000 leucocite/ml mai mult de 10.000 hematii/ml și prezența celulelor uroteliale) sau **calitative** (prin examinarea frotiurilor realizate direct dintr-o picătură de urină necentrifugată, omogenizată, depusă pe o lamă de sticlă și lăsată să se usuce).

Examenul calitativ:

- permite observarea eventualelor microorganisme prezente și alegerea mediilor de cultură în funcție de morfologia și afinitatea lor tinctorială;
- prezența uneia sau mai multor bacterii în câmpul microscopic examinat cu imersie înseamnă $>10^5$ CFU/ml de urină;
- prezența uneia sau mai multor leucocite poate indica o infecție urinară;
- prezența mai multor celule squamoase cu sau fără asocieri de microorganisme semnifică contaminare vaginală, iar dacă rezultatul nu este urgent, se recomandă repetarea probei.

Alternativ, prezența leucocitelor în urină poate fi apreciată prin evidențiarea rapidă a activității esterazei leucocitare.

Însămânțarea probei pentru realizarea examenului bacteriologic (urocultura) necesită o metodă care să permită **determinarea numărului de microorganisme** și **evaluarea cantitativă a bacteriuriei** (diluarea urinii, însămânțarea cu ansa calibrată, metoda lamei sau hârtiei de filtru imersate în urină și amprentate apoi pe mediu cu lactoză timp de 2–3 secunde) (329–332).



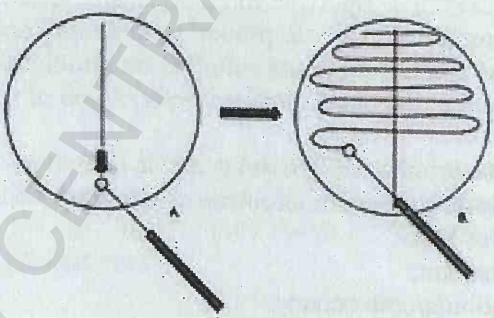


Fig. 329. Însămânțarea probei de urină cu ansa calibrată (se utilizează ansa de 1 µl, cu care se trasează mai întâi un striu longitudinal, apoi striuri transversale perpendiculare pe striul inițial, traseul de însămânțare având aspect de "brad") (WHO, 2003).

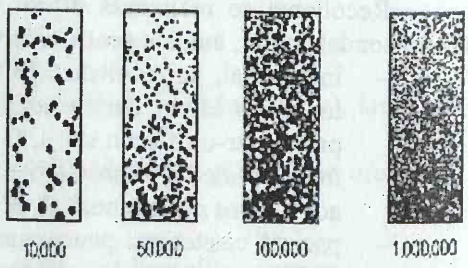
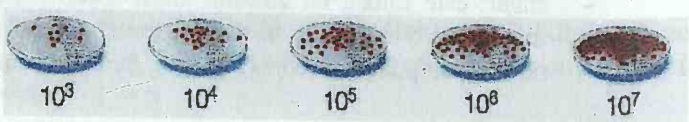


Fig. 330. Intepretarea cantitativă a bacteriuriei prin metoda lamei imersate.

Fig. 331. Interpretarea cantitativă a bacteriuriei pe mediu cromogen (Uriselect 4 – Biorad).



BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

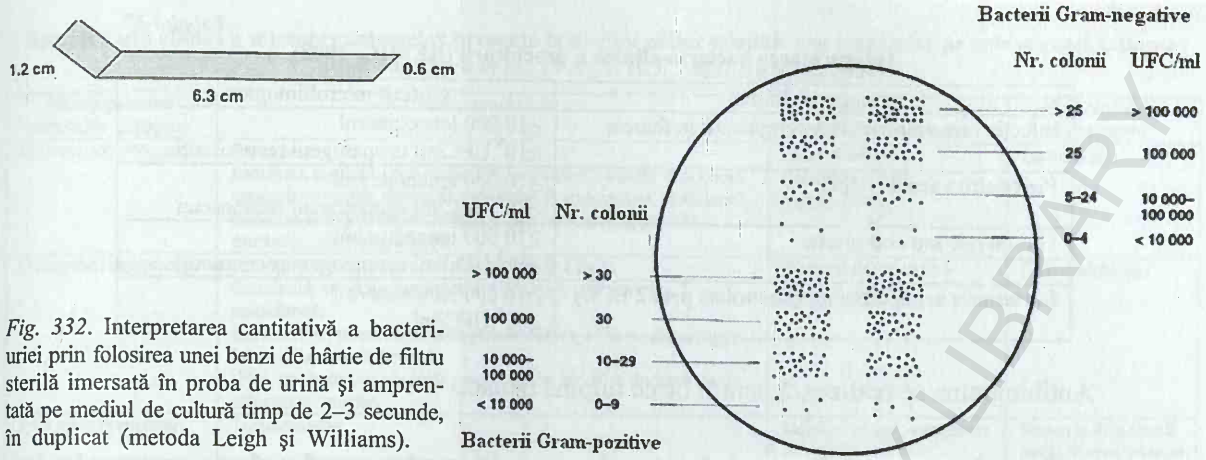


Fig. 332. Interpretarea cantitativă a bacteriuriei prin folosirea unei benzi de hârtie de filtru sterilă imersată în proba de urină şi amprentată pe mediul de cultură timp de 2–3 secunde, în duplicat (metoda Leigh şi Williams).

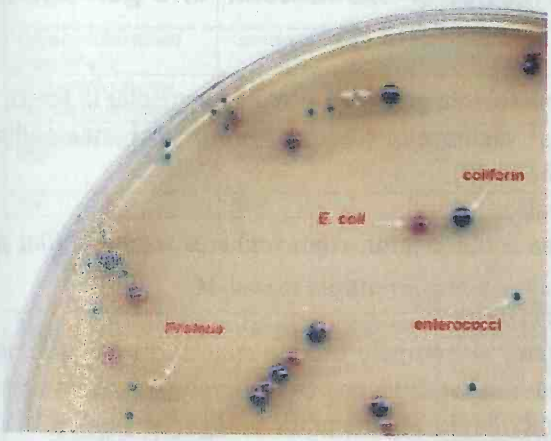


Fig. 333. Diferenţierea coloniilor aparţinând diferitelor specii pe mediu cromogen.

Mediile utilizate sunt mediul lactozat (CLED, MacConkey, brom crezol purpur etc) (pentru izolarea bacililor) şi geloză sânge (pentru izolarea cocilor) sau mediu cromogen, care permite diferenţierea coloniilor aparţinând diferitelor specii pe baza morfologiei şi a culorii acestora (fig. 333).

După incubare timp de 24 ore sau după caz, 48 de ore, se continuă diagnosticul cu identificarea microorganismelor pe baza aspectului coloniilor (dacă s-a utilizat mediu cromogen) sau prin realizarea testelor oxidazei şi catalazei, care vor orienta alegerea galeriilor de identificare (teste individuale – indol, β-glucuronidază -Killian şi Borrow, 1976, TDA, sisteme multitest sau galerii API).

Tabelul 37.

Interpretarea calitativă a creşterii pe medii de cultură (REMIC, 2008).

	Creştere pe geloză sânge	Creştere pe mediu lactozat	Rezultat
Un singur tip de colonii	+	+	BGN, levuri
Un singur tip de colonii	+	–	CGP, corineformi
Un singur tip de colonii	–	–	Bacterii fastidioase, intracelulare, urocultură sterilă
Două sau mai multe tipuri de colonii	+	+	Contaminare: Nu se lucrează !!! Excepţie: pacienţi cateterizaţi.

În funcţie de criteriul bacteriologic (nivelul bacteriuriei), interpretarea clinică a uroculturii este:

- bacteriurie $<10^3$ UFC/ml – absenţa infecţiei;
- bacteriurie $>10^5$ UFC/ml – posibilă infecţie;
- între 10^3 şi 10^4 UFC/ml – incertitudine (se repetă).

Interpretarea rezultatelor ECU combină parametrii clinici, citologici şi bacteriologici (tabelele 37, 38, 39).

Tabelul 38.

Interpretarea rezultatelor ECU (REMIC, 2008).

Diagnostic microbiologic	Bacteriurie	Piurie	Simptome	Tratament
Colonizare	+	–	–	–
Infecţie asimptomatică	+	+	–	+*
Infecţie simptomatică	+	+	+	+
Inflamaţie fără infecţie	–	+	–	±
Simptome fără infecţie	–	–	+	±
*În unele circumstanţe particulare				

BCU IAŞI / CENTRALA UMF "GR. T. POPA" LIBRARY

Tabelul 39.

Interpretarea bacterio-clinică a uroculturii (REMIC, 2008).

Categorii clinice	Criterii microbiologice
Infecție urinară acută fără complicații la femeie	≥10 000 leucocite/ml ≥10^3 UFC/ml uropatogeni recunoscuți
Pielonefrita acuta simplă	≥10 000 leucocite /ml ≥10^4 UFC/ml uropatogeni recunoscuți
ITU cu risc sau complicate	≥10 000 leucocite /ml ≥10^5 UFC/ml uropatogeni recunoscuți
Bacteriurie asimptomatică (controlată prin 2 ECU)	≥10 000 leucocite /ml ≥10^5 UFC/ml

Antibiograma se realizează pentru orice tulpină izolată.

15.6. Examenul bacteriologic al secreţiilor şi exsudatelor ano-genitale se realizează în următoarele scopuri:

- izolarea microorganismelor patogene din microbiota genitală normală, în special la femei;
- diagnosticul infecțiilor de tract genital și al vaginozelor (datorate proliferării anaerobilor sau a bacteriilor de tip *Mobiluncus sp.*) (tabelul 40);
- diagnosticul infecțiilor cu transmitere sexuală;
- stabilirea unei antibioterapii țintite, alegerea antibioticelor, supravegherea tratamentului și a vindecării;
- prevenirea infecțiilor cu transmitere sexuală (BTS).

În funcție de prezența/absența microbiotei, uterul și trompele uterine sunt normal sterile, în timp ce vulva, vaginul și exocolul uterin se colonizează imediat după naștere. Microbiota vulvară este bogată și variată, fiind reprezentată în special de microbiota tegumentară a regiunii perineale și depinde de igiena locală individuală. Microbiota vaginală suferă modificări în raport cu vârsta, depinzând de secreția de hormoni ovarieni și de activitatea sexuală. Astfel, în perioada de activitate sexuală, secreția de estrogeni determină depozitarea glicogenului în celulele epiteliale ale mucoasei vaginale. Dintre speciile normal prezente în microbiota genitală, doar bacilii Döderlein fermentează lactic glicogenul și determină un pH acid al vaginului (3,8–4,2) (fig. 335). În condițiile de pH acid, numeroasele specii din vagin se află într-un echilibru optim, deși unele sunt virulente: specii de *Clostridium, Bacteroides, enterococi, stafilococi, Gardnerella,* levuri, *E. coli,* dar acestea nu proliferează (stare de echilibru sau eubioză).

Dacă valoarea pH se modifică, se instalează *disbioza* și apar vaginozele. Ecosistemul vaginal poate fi perturbat fie de microbiota endogenă, fie de un microorganism exogen. În cazul disbiozei, lactobacilii sunt în minoritate (frotiu colorat Gram sau Giemsa). Examenul microscopic poate face diferența între vaginoze și vaginite, între o colonizare și o infecție cu *Candida* sau o infecție cu *Trichomonas*. La pubertate și după menopauză, lactobacilii sunt înlocuiți cu alte specii (fig. 334a, 335b).

Dintre organele tractului genital masculin, prostata, canalele ejaculatoare, veziculele seminale, epididimul, testiculele sunt fiziologic sterile. Uretra, datorită poziției sale, reprezintă principala cale de acces a infecției nu numai către tractul urinar proximal, ci și către tractul genital. Propagarea infecției se face predominant către organele genitale și mai puțin către cele urinare, principalele microorganisme implicate fiind cele transmise pe cale sexuală.

Secreția uretrală poate fi discretă sau abundentă. În mod normal secreția uretrală conține un număr mic de celule descuamate și bacterii Gram pozitive (coci și difteroizi). Sub raport etiologic, uretritele pot fi gonococice și ne-gonococice. Prezența unei secreții purulente, cu numeroase PMN, dar fără microorganisme pe frotiu și culturi negative, sugerează o etiologie cu *Mycoplasma, Chlamydia*, virus herpetic, *Trichomonas* sau chiar nemicrobiană: medicamentoasă, alergică, traumatisme mecanice etc.

USAMV CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 40.

Semnificaţia clinică a microorganismelor prezente la nivelul căilor genitale sau transmise pe cale sexuală (adaptat după van Dyck et al., 1999; WHO, 2003; REMIC, 2008).

Microorganisme totdeauna patogene	Sindromul clinic	Microorganisme comensale condiţionat patogene	Microorganisme nepatogene
Neisseria gonorrhoeae	Gonoree Bartolinită, cervicită, corio-amnionită, conjunctivită, infecţii gonococice generalizate (artrită, dermatită, tenosinovită), endometrite, epididimită, sterilitate, faringită, vaginită prepubertală, perihepatite, proctite, prostatite, salpingite, uretrite.	*Candida albicans* – balanoprostatite, vulvovaginite	*Lactobacillus*
Chlamydia trachomatis	Limfogranulomatoza venerică (serotipurile L1-L3) Bartolinită, cervicita, conjunctivita la sugari, endometrite, epididimită, (serovar D-K) pneumonie la sugari, sterilitate, otită medie la sugari, boala inflamatorie pelvică (PID), perihepatite, vaginite prepubertale, proctite, sindrom Reiter, salpingita, uretrite.	*Gardnerella vaginalis* – uretrite, vaginite	*Corynebacterium*
Trichomonas vaginalis	Trichomonoza	*Mobiluncus spp.* – vaginoze	*Neisseria.* Alte specii decât *N. gonorrhoeae*
Herpes virus	Herpesul genital şi orolabial, meningite, herpes neonatal, proctite	*Mycoplasma, Ureaplasma* – uretrite	*Staphylococcus* non *aureus*
Calymmatobacterium granulomatis	Granuloma inguinale (donovanoză)	*Staphylococcus aureus*	
Haemophilus ducreyi	Şancrul moale	*Streptococcus spp.*	
Treponema pallidum	Sifilis	Bacterii strict anaerobe	
Cytomegalovirus (CMV)	Infecţii congenitale	Enterobacterii	
HBV	Hepatita B	Papillomavirus – veruci virale, neoplazie cervicală.	
HIV	SIDA		

Tabelul 41.

Metode de recoltare a probelor din tractul genital (adaptat după REMIC, 2008).

Recoltarea produselor de tract genital la ambele sexe	Recoltarea produselor de tract genital feminin	Recoltarea produselor de tract genital masculin
Uretrite: ➢ Prelevat endo-uretral cu tamponul. ➢ Pentru *Chlamydia,* raclaj endo-uretral sau recoltarea primului jet de urină. Ulceraţii ano-genitale: ➢ recoltarea serozităţilor de la nivelul bazei sau marginii ulceraţiei cu vaccinostil, chiuretă sau tampon. ➢ biopsie sau puncţia ganglionului satelit. ❖ Pustule: ➢ colectarea conţinutului cu seringa sau tamponul. ❖ Prelevat anal sau faringian: diagnosticul BTS.	Vulvo-vaginite – recoltarea cu tamponul a secreţiilor din orificiul vaginal şi vestibulul vaginal posterior. Bartolinite – aspirarea cu seringa din canal sau prelevarea cu tamponul. Cervicite – recoltare cu tamponul din endocol. Endometrite – prelevat din endocol şi eventual aspirarea transcervicală prin cateter. Anexite – lichidul de abces este prelevat cu seringa şi celulele tubo-peritoneale prin raclaj în cursul intervenţiei chirurgicale.	Epididimite, prostatite – tampon uretral, prelevarea spermei sau recoltarea primului jet de urină. Prostatite – recoltarea secreţiilor prostatice dupa eventualul masaj al prostatei şi/sau primul jet de urină. Orhite – puncţionarea abcesului cu seringa (de către chirurg). Agentul infecţios poate fi regăsit şi în spermă.
În toate cazurile se recoltează două sau trei probe (examinare directă şi însămânţare). Dacă prelevările nu sunt efectuate în laborator, probele trebuie transportate rapid pe medii de transport adecvate (pentru gonococ, *Chlamydia, Mycoplasma,* virus). Secreţia ataşată pe suprafaţa valvelor de recoltare, poate servi la efectuarea a 2 teste preliminarii: determinarea valorii pH (pH > 5 este întâlnit în infecţia cu *Trichomonas* şi în vaginoze) şi testul aminelor volatile (prin adăugarea a câtorva picături de soluţie de KOH 10% peste proba de secreţie vaginală recoltată pe valvă. Degajarea unui miros dezagreabil de peşte alterat conduce la suspiciunea de vaginoză). Pentru diagnosticul vaginitei cu *Trichomonas,* se execută rapid examinarea preparatului proaspăt lamă-lamelă, pe care protozoarul are forma şi mobilitatea caracteristice. Protozoarele îşi pierd mobilitatea pe tamponul de vată (fig. 334a). Al doilea tampon este folosit pentru executarea unui frotiu Gram, care permite aprecieri cantitative sau calitative ale microbiotei vaginale. Al treilea tampon, în cazul unei secreţii purulente, este utilizat pentru însămânţare pe medii de cultură adecvate.		

Datele clinice şi epidemiologice, aspectul leziunilor şi localizarea lor, observate în cursul prelevării (tabelul 41) sunt indispensabile pentru orientarea diagnosticului bacteriologic. Ele condiţionează valoarea rezultatului care se obţine după examinarea citobacteriologică directă (tabelul 42) urmată, după caz, de cultivare (tabelul 43), tehnici de biologie moleculară şi examen serologic.

Tabelul 42.

Examenul microscopic al secreţiilor tractului genital

Ulceraţii	Microscop cu fond întunecat (ob. 10x) imunofluorescenţă directă (IF), impregnare argentică sau coloraţia Vago.	*T. pallidum* NB: pacienţii pozitivi la examinarea directă pot fi serologic negativi, pozitivarea serologică putând apărea în câteva săptămâni.
	Coloraţia May-Grundwald-Giemsa	*Haemophilus ducreyi* (fig. 337)
	IF	Ulceraţii externe de tip herpetic asociat cu *Chlamydia* (boala Nicolas-Favre) sau cu *Mycoplasma.*
Granulom inghinal	Coloraţia May-Grundwald-Giemsa pe frotiuri fixate cu acetonă.	Corpii lui Donovan (reprezentaţi de *Calymmatobacterium granulomatis* sau *donovani,* bacili capsulaţi, internalizaţi în histiocite (van Dyck et al., 1999) (fig. 338).

Uretrite, cervicite şi vaginite / secreţie vaginală.	Coloraţia Gram	*N. gonorrhoeae* *C. albicans* Studiul microbiotei vaginale: scor de la I la IV (scor I – microbiotă echilibrată, scor II, III – dezechilibrul microbiotei cu lactobacili prezenţi, scor IV – microbiotă complet substituită în favoarea anaerobilor sau *Gardnerella vaginalis*, lactobacili absenţi).
	Preparat proaspăt în KOH 10% şi vizualizare cu contrast de fază.	*C. albicans*
		T. vaginalis
	Coloraţia May-Grundwald-Giemsa sau Papanicolaou.	"Clue-cells" din vaginoză *T. vaginalis* (fig. 336) Incluzii intracelulare – infecţii cu *Chl. trachomatis*.
	IF	*Chl. trachomatis*
Spermă	Preparat proaspăt Frotiu colorat Gram	Levuri (fig. 334b) *T. vaginalis* Rar ouă de *Schistosoma* *N. gonorrhoeae* Levuri (*C. albicans*) Coci Gram pozitivi Bacili Gram negativi Prezenţa sau absenţa leucocitelor.
Alte produse	Preparat proaspăt sau frotiu examinat Gram sau cu IF	*N. gonorrhoeae* *C. albicans* *Chl. trachomatis*

Tabelul 43.

Cultivarea probelor recoltate din tractul genital

Mediu de cultură	Agenţi patogeni izolaţi
Geloză sânge	*Str. agalactiae* *S. aureus* *Gardnerella vaginalis* (considerată patogenă atunci când este dominantă numeric sau când este asociată cu bacterii anaerobe *Mobiluncus spp).*(fig. 335, 337).
Geloză sânge incubată în anaerobioză.	*Prevotella* (endometritele postpartum sau infecţii asociate dispozitivelor intrauterine).
Mediu lactozat	Bacterii Gram negative (în special enterobacterii).
Geloză chocolat	*N. gonorrhoeae* Rar, *Haemophilus ducreyi* (fig. 337)
Culturi celulare	*Chl. trachomatis*
Medii artificiale îmbogăţite cu ser bovin şi extract de levuri.	*Mycoplasma hominis* *Ureaplasma urealyticum*
Medii speciale pentru micobacterii.	*M. tuberculosis* (endometrite, epididimite).

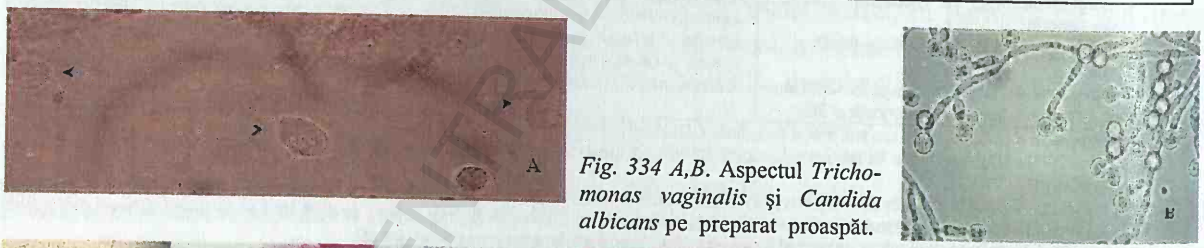


Fig. 334 A,B. Aspectul *Trichomonas vaginalis* şi *Candida albicans* pe preparat proaspăt.

Fig. 335. Diferite aspecte ale frotiului din secreţie vaginală colorat Gram. De la stânga la dreapta: microbiota normală; microbiotă substituită; coci Gram pozitivi; levuro-filamentoasă; *Leptotrichia*; *Mobiluncus* sp.; vaginoză cu *Gardnerella.*

Fig. 336. Trichomonas vaginalis, pe frotiul colorat cu albastru de metil

Fig. 337. Haemophilus ducreyi, pe frotiul colorat Gram (G. Hammond, Public Health Image Library, CDC, 1978).

Fig. 338. Bacili capsulaţi, intracelulari – *Calymmatobacterium granulomatis* (frotiu colorat Giemsa) (O'Farrell, 2002).

BCU CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Antibiograma se realizează sistematic pentru microorganismele izolate din infecţiile tractului genital superior, pentru cele *patogene*, pentru tulpinile de gonococ cu determinarea producătorilor de β-lactamaze şi nu se practică pentru bacteriile care colonizează în mod normal tractul genital inferior în special la femeie, excepţie făcând *Str. agalactiae* (β-hemolitic de grup B) izolat în cursul celui de-al treilea semestru de sarcină, tratat pentru a preveni posibilitatea unei infecţii neonatale.

15.7. Diagnosticul bacteriologic al materiilor fecale. Coprocultura

Infecţiile enterice bacteriene (diareea, dizenteria şi febrele enterice) sunt factori de risc importanţi pentru sănătatea publică în întreaga lume. Diareea infecţioasă constituie a doua cauză de deces la nivel mondial după bolile cardiovasculare, mai ales în populaţia infantilă. În ţările în curs de dezvoltare, boala diareică provoacă 1,5 milioane de decese anual la copiii de 1–4 ani (riscul de îmbolnăvire la această categorie de vârstă fiind de 600 ori mai mare în ţările în curs de dezvoltare decât în ţările dezvoltate). În ţările în curs de dezvoltare, copiii suferă de zece sau mai multe episoade de diaree pe an, fiind frecvent infectaţi concomitent cu mai mulţi agenţi enteropatogeni, uneori chiar şi în absenţa simptomatologiei. Odată cu creşterea prevalenţei HIV/SIDA şi a chimioterapiei imunosupresoare, a crescut numărul de cazuri de boală diareică la pacienţii imunocompromişi. Infecţiile enterice bacteriene identificate la pacienţii cu HIV/SIDA sunt produse de *Campylobacter, Salmonella* (salmoneloza este de 20 de ori mai frecventă la aceşti pacienţi), *Shigella* şi micobacterii (WHO, 2003).

Coprocultura se recomandă în cazul în care scaunul este lichid sau moale, mucilaginos sau hemoragic sau la indicaţii foarte precise, pentru cele solide.

Diareea poate fi acută sau cronică, însoţită sau nu de o stare febrilă. Nu toate episoadele diareice sunt de natură infecţioasă sau cu etiologie bacteriană, paraziţii, virusurile şi levurile putând fi de asemenea isolate (tabelele 44, 45).

Tabelul 44.

Etiologia infecţioasă a bolii diareice (WHO, 2003; REMIC, 2008).

	Principalele microorganisme care determină diaree
Bacterii	*Salmonella, Sh. dysenteriae, Sh. flexneri, Sh.boydii, Sh. sonnei, Campylobacter jejuni, C. coli, Yersinia enterocolitica, EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, DAEC, EaggEC, V. cholerae, V. fluvialis, V. hollisae, V. mimicus, Aeromonas hydrophila, A. sobria, A. caviae, S. aureus, B. cereus, Cl. difficile, Cl. perfringens, Cl. botulinum.*
Virusuri	*Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Coronavirus,* virusul Norwalk.
Protozoare	*Entamoeba, Giardia, Isospora, Cryptosporidium, Balantidium.*
Helminţi	*Schistosoma, Strongyloides, Ancylostoma, Necator, Trichuris, Trichinella.*
Levuri	

Obiectivul principal al coproculturii constă în determinarea microorganismelor patogene care produc diaree, prin izolarea acestora dintr-o microbiotă complexă, de o mare densitate şi diversitate, care conţine 10^9–10^{11} bacterii/ gram de conţinut intestinal şi este reprezentată de peste 400 specii diferite, dintre care marea majoritate sunt strict anaerobe. Enterobacteriile reprezintă 5-10% cu predominanţa *E. coli*. Enterococii, streptococii, stafilococii, lactobacilii şi levurile sunt prezente într-un număr mai mic.

Prelevarea şi transportul probelor

Scaunele sunt prelevate într-un recipient corespunzător (coprorecoltor), curat, de unică utilizare, fiind interzisă utilizarea recipientelor artizanale de tipul cutiilor de chibrituri; se va recolta cel puţin un volum de 3–5 cm^3, egal cu o nucă, cu ajutorul unei spatule sau a unui recipient cu lopăţică şi apoi este transferat într-un recipient ermetic închis. Când acestea există, se recoltează porţiunile muco-purulente sau sanguinolente.

Recoltarea cu ajutorul unui tampon rectal sau cu sonda Nelaton este utilizată mai ales în cazul sugarilor şi al copiilor mici, în shigelozele cronice sau la investigarea purtătorilor de *Shigella* şi *Salmonella* (cu excepţia celor de *S. typhi*). După prelevare, produsul patologic se introduce în tuburi sterile cu mediu de conservare.

Biopsiile mucoasei rectale sau colice realizate prin endoscopie sunt analizate ca şi materiile fecale, cu excepţia examenului specific pentru micobacterii.

Tabelul 45.

Contexte care necesită realizarea unei coproculturi (WHO, 2003; REMIC, 2008).

Context	Indicații pentru coprocultură	Agenți patogeni identificați	Cultivare
Adult sau copil peste doi ani și context bine definit.	Coprocultură standard	*Salmonella* spp. Identificarea până la nivel de serovar se justifică doar în scop epidemiologic *Shigella* spp. *Campylobacter* spp. *Yersinia enterocolitica* *EIEC.*	Mediu de îmbogățire pentru *Salmonella* și *Shigella* (Mueller-Kauffmann, Selenit). Mediu selectiv de izolare (geloză SS, XLD, DCL, Hektoen). Se recomandă repicarea de pe mediu de îmbogățire pe mediu selectiv după 3–6 ore de incubare la 37°C. Identificare biochimică. Confirmare serologică. Medii specifice pentru *Campylobacter* spp. (Karmali, Skirrow sau Buztler). Culturile sunt incubate minim 48 ore la 42°C, în microaerobioză, cu 10% CO_2. *Yersinia enterolitica* – însămânțare pe mediu de îmbogățire (mediu Rapapport), incubare 24–48 ore la +4°C și repicare pe medii specifice pentru *Yersinia* – mediu Wauters (geloză SS îmbogățită cu dezoxicolat) sau mediu Irgasan-cefsulodin și novobiocin incubate timp de 48 ore la 30°C.
Copil sub 2 ani	Coproculturi standard cu accent pe *E. coli* enteropatogen. La această categorie de vârstă predomină etiologia virală.	+ *E. coli* enteropatogen (EPEC), *Rotavirus,* Adenovirus.	+ EPEC pe mediu EMB sau Drigalski.
Nou născuți	Meconiu	*L. monocytogenes* *E. coli* K1 *Str. agalactiae* (grup B).	
Contexte epidemiologice și clinice particulare	Pacienți HIV /SIDA	Bacterii enteropatogene. Virusuri (CMV, HSV, HIV). Protozoare (*Entamoeba histolytica, Isospora belli, Giardia intestinalis,* cryptosporidii, microsporidii).	
	Determinarea stării de purtător la personalul cu risc	Persoanele din anturajul unui pacient, *Ps. aeruginosa* la nou-născuți.	
	Detectarea colonizării de bacterii multirezistente	Enterococ rezistent la vancomicină sau enterobacterii producătoare de β-lactamaze cu spectru larg.	Izolare VRE pe geloză bilă esculină cu 6 mg/l vancomicină ESBL – pe mediu Drigalski cu 0,5-1 mg/l cefotaxim
	Sindrom hemolitic uremic	*E. coli* 0157 și alte tulpini de *E. coli* producătoare de verotoxine.	Izolarea de *E. coli* pe geloză MacConkey cu sorbitol, coloniile sorbitol (-) sunt confirmate prin latex aglutinare.
	Sindrom holeriform	*V. cholerae, ETEC*	*V. cholerae* – îmbogățire în apa peptonată alcalină repicată la fiecare 3 ore pe mediu gelozat specific (de ex. TCBS). Identificare biochimică. Confirmare serologică.
	Bolnavi aflați sub tratament cu antibiotic Colită pseudomembranoasă	*Cl. difficile, C. albicans* *S. aureus, K. oxytoca, Ps. aeruginosa, C. albicans, Cl. perfringens* producător de enterotoxine.	Evidențierea toxinei B în filtratul de materii fecale Determinarea ECP pe culturi celulare (fibroblaste, celule Vero, MRC-5, Mac Coy). Determinarea toxinei A prin tehnica ELISA.
	Toxiinfecție alimentară colectivă cu perioadă scurtă de incubare (1–4h).	*S. aureus* *B. cereus*	Evidențierea toxinelor în filtratul de materii fecale, lichid de vărsătură, aspirate gastrice, serul bolnavului (toxina botulinică).
	Toxiinfecție alimentară colectivă cu perioadă de incubare scurtă (12–72 ore)	*Salmonella spp. Yersinia enterocoditica, Cl. botulinum, Cl. perfringens.*	
	Diaree sero-sangvinolentă toxică cu lipsa elementelor polinucleare la examinarea directă consecutiv ingestiei de apă și alimente. Voiaj într-o țară tropicală	*Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides.*	*Aeromonas* spp. – geloză sânge cu adaos de ampicilină.
	Intoxicație alimentară	Suspiciune de botulism	Tipizarea toxinei din serul bolnavului și din alimentele suspectate.

Proba trebuie să fie imediat transportată la laborator sau conservată maxim o noapte la +4°C pentru a se evita desicarea și proliferarea bacteriilor și levurilor comensale. Pentru aceasta se folosește un mediu de transport adecvat (Stuart, Amies, Cary Blair, apă peptonată, soluție TRIS tamponată etc.).

Pentru izolarea virusurilor, se folosesc recipiente sterile, cu 5–10 cm^3 materii fecale. Proba se refrigerează până în momentul examinării.

Identificarea agenților patogeni izolați presupune atât evidențierea unor caractere biochimice, cât și confirmarea serologică, în cazul unor specii (fig. 339–343).

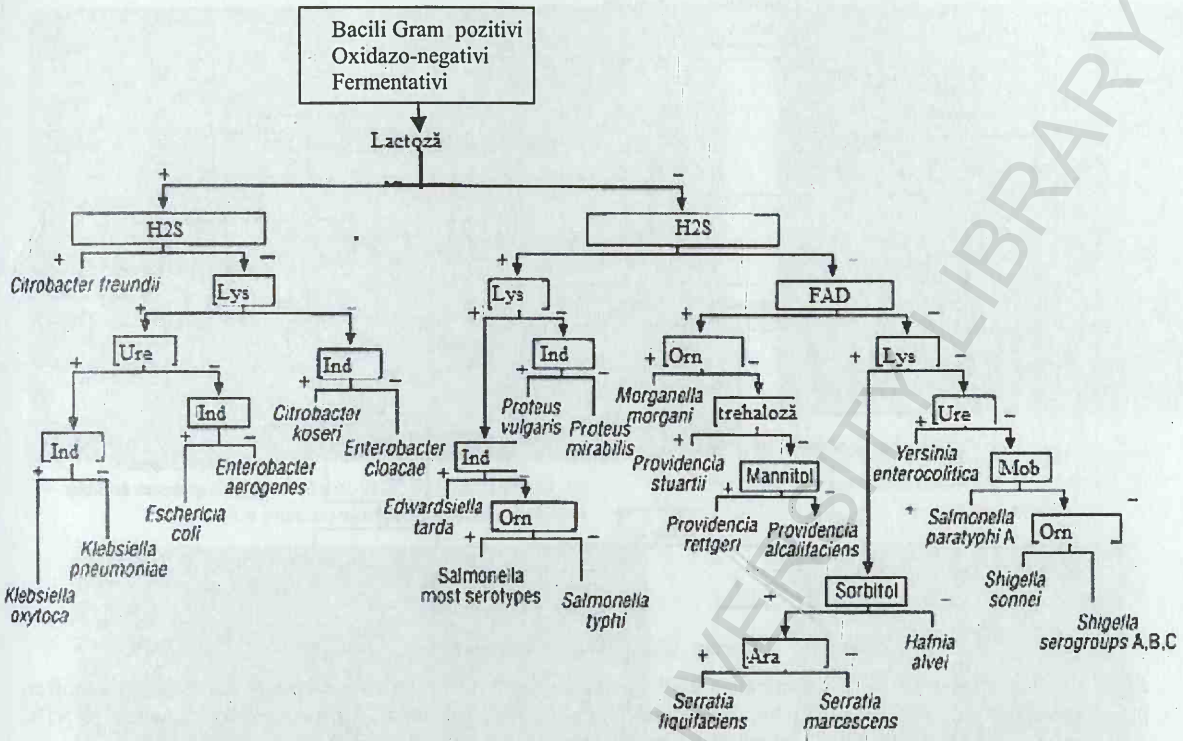


Fig. 339. Cheie dichotomică de identificare a enterobacteriilor pe baza unor caractere biochimice (fermentarea lactozei, producerea H_2S, prezența lizin-decarboxilazelor - Lys, fenilalanin/dezaminazelor – FAD, ureazei – URE; producerea de indol – Ind, producerea ornitin-decarboxilazelor – Orn, fermentarea unor zaharuri) (WHO, 2003).

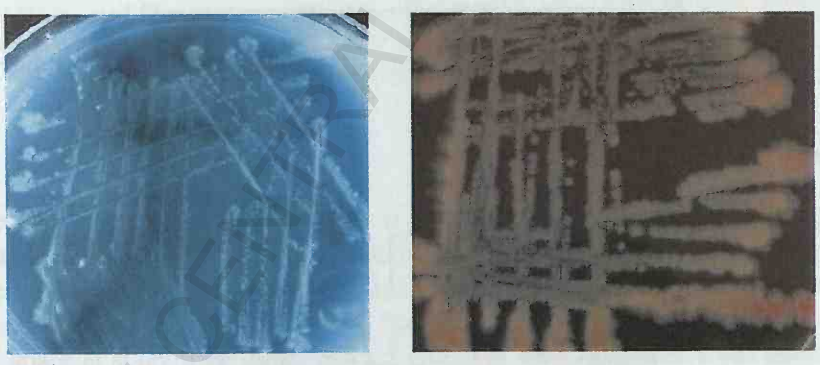


Fig. 340. Shigella sonnei pe medii lactozate (CLED, MacConkey) (colonii lactoză-negative).

Fig. 341. S. tiphymurium pe mediu lactozat (CLED) (colonii lactoză-negative) și *K. pneumoniae* pe medii lactozate (CLED, MacConkey) (colonii lactoză-pozitive, mucoide).

BCU TIRGU MURES CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

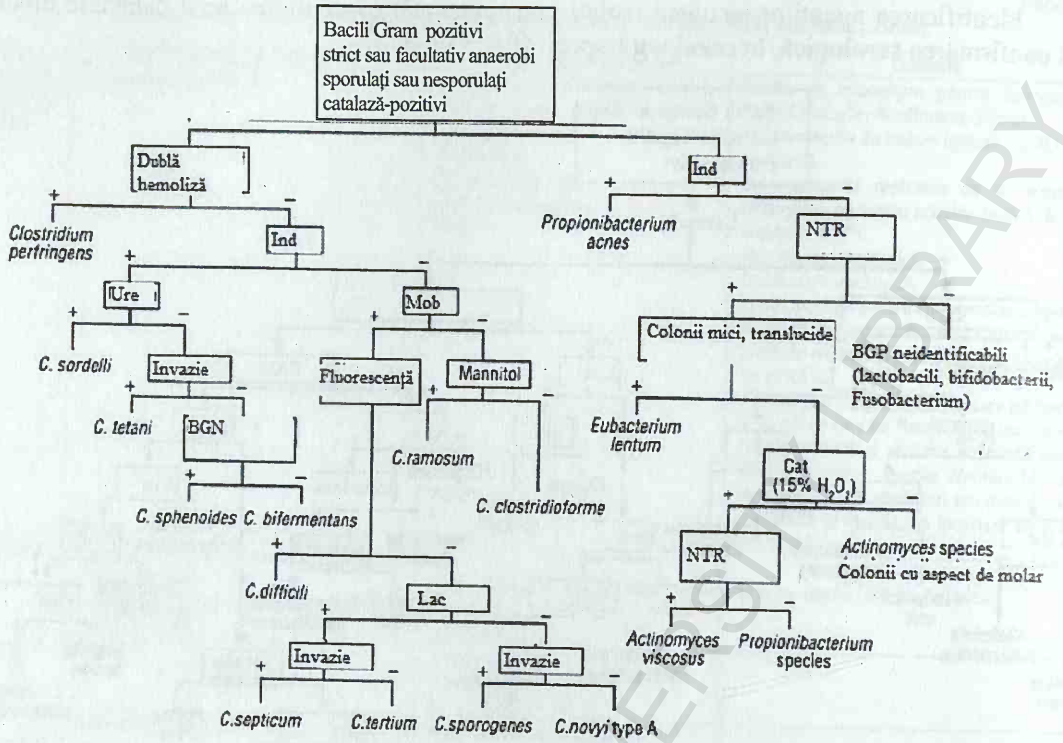


Fig. 342. Cheie dichotomică de identificare a BGP, catalază-negativi, pe baza unor caractere biochimice (hemoliza, producerea indolului – Ind, ureazei – Ure, fermentarea unor zaharuri – Lac, manitol, prezența nitrat-reductazei – NTR, invazia pe mediu solid repartizat în plăci, producerea catalazei – Cat) (WHO, 2003).

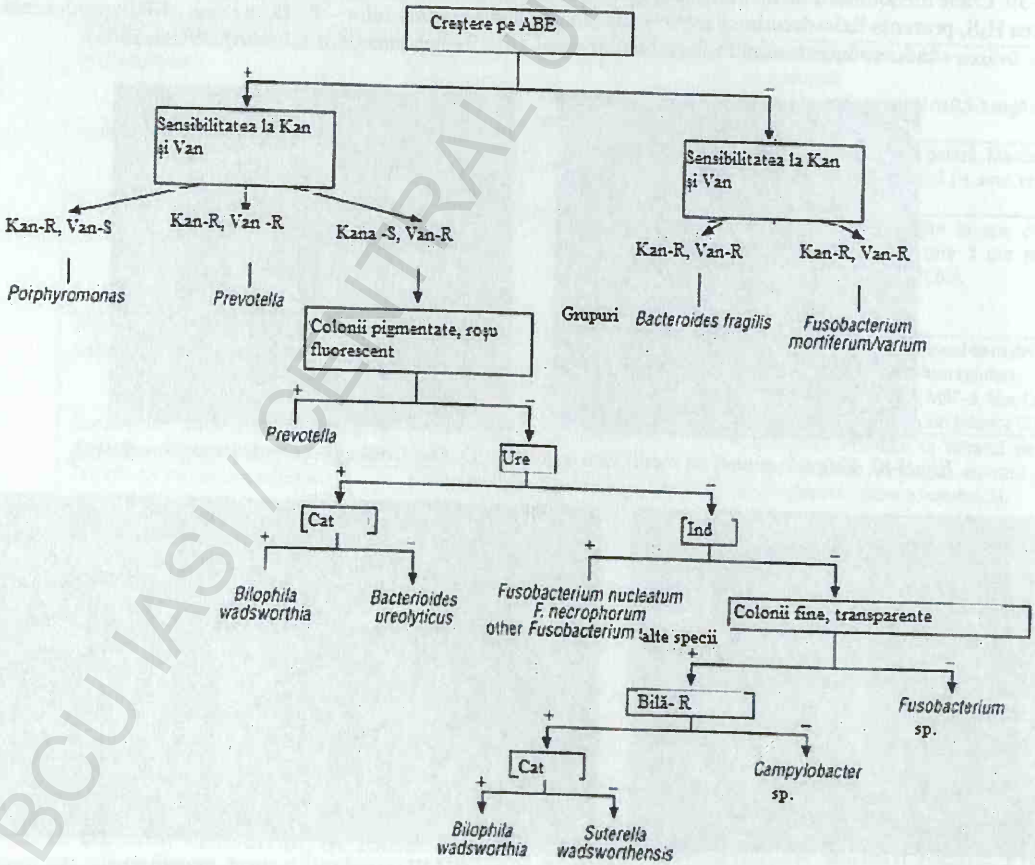


Fig. 343. Cheie dichotomică de identificare a BGN anaerobi, catalază-negativi, pe baza unor caractere de cultură și biochimice (WHO, 2003).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Antibiograma este recomandată pentru toți agenții patogeni izolați și imperativ necesară pentru *Salmonella, Shigella, E. coli, V. cholerae* (fig. 344–347).

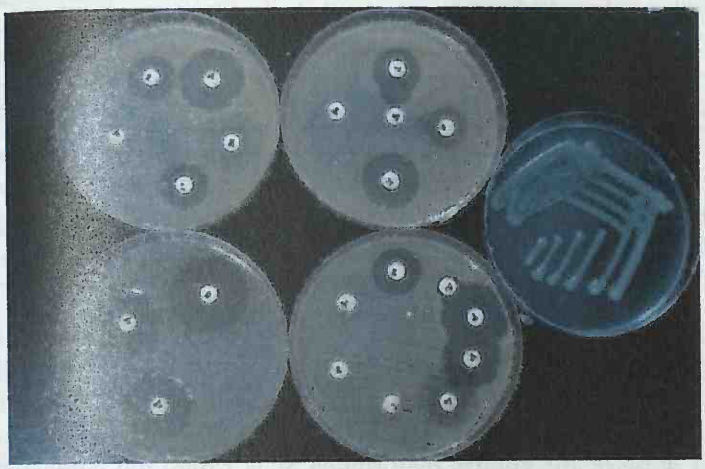


Fig. 344. Antibiograma unei tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL.

Fig. 345. Confirmarea prin E-test a producerii de ESBL la o tulpină de *K. pneumoniae.*

Fig. 346. Testul Hodge modificat, pentru eviden-țierea producerii de carbapenemaze la o tulpină de *K. pneumoniae* (aspectul de treflă al zonei de inhibiție indică producerea de carbapenemaze).

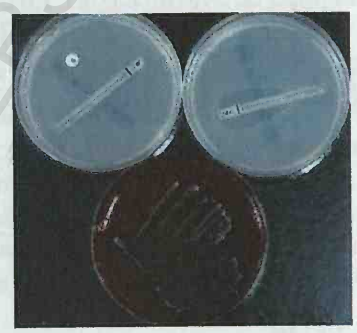


Fig. 347. Tulpină de *E. faecium* izolată din coprocultură, rezistentă la vancomicină, confirmată prin E-test.

15.8. Hemocultura

Sângele este cultivat pentru detectarea și identificarea bacteriilor sau a altor microorganisme cultivabile (levuri, fungi filamentoși) prin metode clasice sau automate de detectare a creșterii microbiene. Prezența unor astfel de organisme în sânge se numește bacteriemie sau fungemie și este de obicei patologică, deoarece sângele este în mod normal steril, cu câteva excepții: bacteriemia tranzitorie care apare la scurt timp după: extracții dentare sau tratamentele stomatologice, intervenții chirurgicale la nivelul mucoaselor contaminate, contaminare intravenoasă pe cale iatrogenă, bronhoscopie, sau cateterizare uretrală. Bacteriemia tranzitorie poate apărea în infecțiile localizate, precum artrita, escarele, colecistită, enterocolită, meningită, osteomielită, peritonită, pneumonie, pielonefrită, infecții traumatice sau ale plăgilor chirurgicale. Acest tip de bacteriemie tranzitorie se remite de obicei spontan, după fagocitarea bacteriilor comensale. Septicemia este un termen clinic utilizat pentru a descrie bacteriemia însoțită de manifestări clinice care apare în infecțiile severe, cu frisoane, febră, stare de rău general, toxicitate, hipotensiune arterială, forma extremă fiind șocul toxic produs de toxinele bacteriilor Gram negative (LPS) sau ale cocilor Gram pozitivi (acizi teichoici, superantigene) (Mihăescu, 2000; Mihăescu și colab., 2005; 2007). Bacteriemia persistentă apare în bruceloză, leptospiroză, febră tifoidă, endocardite, anevrisme infectate și tromboflebită.

O stare septicemică se caracterizează prin trecerea repetată a microorganismelor în sânge. Febra de origine necunoscută, mai ales dacă este acompaniată de semne clinice evocatoare ale unei infecții, necesită efectuarea unei hemoculturi (tabelul 46).

Tabelul 46.

Criterii predictive ale bacteriemiei (Bates, 1990).

Factor de predicție pentru hemoculturi pozitive	Punctaj
Temperatura >38,3°C	3
Maladie rapid fatală	4
Maladie terminală	2
Prezența frisonului	3
Toxicomanie pe cale venoasă	4
Abdomen chirurgical acut	3
Factor de co-morbiditate majoră[a] [a] - coma sau moartea cerebrală, perforare digestivă, multitraumatisme, stop cardiorespirator, insuficiență hepatică acută sau cronică	3
Risc crescut de bacteriemie	scor ≥6
Risc scăzut de bacteriemie	scor ≤2

Datele epidemiologice arată că *S. aureus* şi *E. coli* sunt speciile cel mai des izolate din hemoculturi pozitive. *S. aureus, E. coli,* enterobacteriile, *Ps. aeruginosa* şi *C. albicans* sunt în 90% cazuri patogene. Interpretarea hemoculturilor pozitive este de asemenea, dificilă în cazul streptococilor de grup viridans, *Enterococcus* şi SCN. Frecvența izolării SCN a crescut considerabil în ultimul timp, dar numai 10–20% din aceste izolate au semnificație clinică, majoritatea SCN izolați din hemoculturi fiind contaminanți. *Bacillus, Corynebacterium* şi *Propionibacterium* produc bacteriemii semnificative în mai puțin de 5% din cazuri. Frecvența anaerobilor rămâne scăzută, mai ales la copii.

Varietatea microorganismelor ce pot fi regăsite în sânge creşte la pacienții imunocompromişi. Speciile în cauză sunt numeroase şi cu exigențe nutritive variate, ceea ce duce la dificultatea izolării acestora (tabelul 47).

Tabelul 47.

Agenți patogeni implicați în etiologia bacteriemiilor şi fungemiilor (WHO; 2003).

Bacterii Gram negative	Bacterii Gram pozitive şi fungi
E. coli *Klebsiella spp.* *Enterobacter spp.* *Proteus spp.* *S. typhi* *Salmonella spp.* alte specii decât *S. typhi* *Ps. aeruginosa* *N. meningitidis* *H. influenzae* *Bacteroides fragilis (anaerobe)* *Brucella spp.* *Burkholderia (Ps.) pseudomallei* (în anumite zone geografice)	*Streptococi viridans* *S. aureus* *S. epidermidis* *Str. pneumoniae* *E. faecalis (grup D)* *Str. agalactiae (grup B)* *L. monocytogenes* *Cl. perfringens* *Peptostreptococcus spp. (anaerobi)* *Str. pyogenes* (grup A) *M. avium-intracelulare* (complexul Mac) la pacienți SIDA. *M. kansasii* *M. tuberculosis* *C. albicans* *C. glabrata* *C. krusei* *C. tropicalis* *C. parapsilosis.* *Histoplasma capsulatum* *Cryptococcus neoformans* *Malassezia furfur* *Fusarium* *Penicillium.*
Bacterii cu creştere lentă şi dificilă *Brucella* *Campylobacter* *Legionella* *Mycoplasme – Ureaplasma* *Leptospira* Grupul HACEK - *Haemophilus aphrophilus, A. actinomicetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens* şi *Kingella kingae* Streptococi deficienți (*Abiotrophia*) *Bartonella (Rochalimaea)*	

Recoltarea probelor

Aseptizarea zonei de recoltare

Asepsia pielii se face succesiv cu alcool 70%, apoi cu un produs iodat (tinctura de iod 2% sau polividona iodată 10%) sau clorhexidină 0.5%, care este lăsat să acționeze 1–2 minute pentru

obținerea efectului aseptic. Activitatea bactericidă a tincturii de iod este mai rapidă decât a polividonei. După puncția venoasă, produsul iodat potențial iritant trebuie îndepărtat cu alcool 70%.

Dezinfecția capului flaconului de hemocultură se face cu alcool 70% sau cu produs iodat.

Chiar și după o dezinfecție atentă, unele bacterii persistă în straturile mai profunde ale pielii și pot contamina proba (de exemplu, *S. epidermidis, Propionibacterium acnes*, spori de *Clostridium*). Pseudobacteriemia (hemocultură fals-pozitivă) poate rezulta și din utilizarea soluțiilor antiseptice, seringilor sau acelor contaminate. Izolarea repetată a unui microorganism neobișnuit (de exemplu, *Burkholderia (Ps.) cepacia, Pantoea (Enterobacter) agglomerans* sau *Serratia* spp.) în același spital indică suspiciunea unei infecții nosocomiale și necesitatea unei anchete epidemiologice. O altă sursă de contaminare este contactul acului cu dopurile flacoanelor nesterilizate (sau cu soluții nesterile), în cazul în care aceeași seringă este folosită inițial pentru recoltarea de sânge pentru analize chimice sau VSH.

Recoltarea prin puncție venoasă

Puncția venoasă este singura metodă fiabilă pentru prelevarea sângelui în vederea hemoculturii. Recoltarea prin cateter crește riscul contaminării.

Densitatea bacteriilor prezente în sânge este în general foarte scăzută la adult (mai mică de 1 UFC/ml). Un volum de 20 ml de sânge asigură un procent de pozitivitate a hemoculturii cu 30% mai mare, comparativ cu un volum de 10 ml care este minimum necesar la adult.

La copii, densitatea bacteriilor în sânge este mai mare decât la adult, un volum de 1–2 ml fiind considerat suficient. Acest volum poate fi crescut în funcție de vârstă (2–5 ml).

Datorită caracterului intermitent sau tranzitoriu al bacteriemiei, se recomandă recoltarea a 2–3 hemoculturi (la un interval optim de 30-60 minute). Momentul optim de recoltare este în timpul frisoanelor sau al episoadelor termice maxime. Recoltarea mai multor hemoculturi permite de asemenea demonstrarea implicării unor microorganisme comensale în etiologia bacteriemiei și excluderea posibilității contaminării probei în timpul recoltării.

Chiar în condiții ideale de recoltare a sângelui pentru hemocultură, în 3–5% din culturi pot crește contaminanți de pe piele (*S. epidermidis, Propionibacterium acnes, Clostridium spp.*, difteroizi) sau din mediul înconjurător (*Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp.). Aceste microorganisme se pot comporta uneori ca agenți patogeni și pot cauza endocardita.

O infecție adevărată este suspectată în cazurile în care:

- același organism crește în ambele flacoane de hemocultură recoltate în același timp;
  același organism crește în două flacoane recoltate la intervale diferite;
- creșterea este rapidă (în 48 de ore), ceea ce înseamnă o densitate bacteriană inițială mare;
  două tulpini izolate aparținând aceleiași specii au același biotip și profil de sensibilitate la antibiotice.

Toate rezultatele hemoculturii trebuie raportate clinicianului, inclusiv contaminanții, cu menționarea statutului respectiv (de exemplu, *P. acnes* – comensal cutanat, *S. epidermidis* – probabil contaminant). Pentru contaminanți nu trebuie efectuată antibiograma. Identificarea a două sau mai multe specii sau tulpini poate indica o bacteriemie polimicrobiană, care poate să apară în cazul pacienților imunodeprimați sau o bacteriemie cu anaerobi (de exemplu, asocierile multispecifice dintre anaerobi și aerobi apar în bacteriemiile fulminante severe asociate cu traumatisme severe sau cu intervenții chirurgicale care implică intestinul gros).

Însămânțarea probelor

Se însămânțează 2 flacoane, pentru incubare în condiții de aerobioză și anaerobioză (pe lângă bacteriile strict anaerobe, streptococii și enterococii se dezvoltă mai rapid în condiții de anaerobioză).

Sângele conține numeroase substanțe cu activitate antimicrobiană (complement, lizozim, celule fagocitare și antibiotice), motiv pentru care, pentru hemocultură sângele este diluat 1/10 în mediul de cultură.

Mediul de cultură conține de asemenea un anticoagulant (polietanol sulfonat de sodiu – SPS), utilizat la o concentrație de 0,025–0,05%, ce favorizează creșterea majorității microorganismelor, prin inhibarea activității bactericide a serului (inhibă fagocitoza, inactivează complementul, neutralizează lizozimul și antibioticele din clasa aminoglicozidelor). SPS poate avea efect inhibitor asupra unor

specii de *Neisseria*, *Peptostreptococcus anaerobius* sau de *Streptobacillus moniliformis*. Adăugarea de gelatină în mediu la o concentrație de 1,2% poate neutraliza efectul inhibitor al SPS. Mediul de cultură conține de asemenea rășini schimbătoare de ioni, cu efect neutralizant față de antibiotice. Se recomandă realizarea prelevărilor "la distanță" față de perioada de administrare a antibioticelor.

Incubarea probelor

Flacoanele de hemocultură sunt incubate timp de 7 zile la 35^{0}C, iar în cazul sistemelor automate, 5 zile. Peste aceasta perioadă, bacteriile detectate sunt în general contaminanți care au fost prezenți în prelevat în cantitate mică. Un timp de incubare mai lung poate fi necesar pentru microorganisme particulare: levuri, fungi, bacterii din grupul HACEK, *Brucella* sau *Legionella* și pentru pacienții suspectați de endocardite, la care prelevatele au fost realizate sub tratament cu antibiotice.

Examinarea probelor

În cazul sistemelor convenționale, flacoanele se examinează zilnic sau de 2 ori/zi, în vederea observării semnelor unei creșteri vizibile.

Tabelul 48.

Examinarea macroscopică a flacoanelor de hemocultură.

Aspect macroscopic	Etiologie posibilă
Turbiditate	Bacili Gram negativi aerobi, stafilococi, *Bacteroides*
Hemoliză	Streptococi, stafilococi, *Listeria, Clostridium, Bacillus*
Producere de gaz	Bacili Gram negativi aero-anaerobi
Coagulare	*S.aureus.*

Dacă la examinarea microscopică (tabelul 48) se evidențiază stafilococi sau bacili Gram negativi, hemocultura poate fi utilizată ca inocul pentru realizarea unei antibiograme nestandardizate rapide, care poate fi citită după 6 ore, pentru a grăbi decizia terapeutică.

Detectarea precoce a creșterii microbiene în sistemele convenționale poate fi îmbunătățită prin:

- agitarea flacoanelor aerobe în timpul primelor 24 ore de incubare;
- aerarea flacoanelor aerobe cu un dispozitiv adaptat care favorizează creșterea tulpinilor de *Pseudomonas;*
- detectarea prezenței bacteriene pe frotiuri;
- repicarea sistematică precoce (între 6 și 24 ore) a flaconului de anaerobioză pe geloză chocolat incubată în aerobioză la 35°C;
- utilizarea sistemelor difazice, ce permit creșterea precoce a coloniilor pe mediul gelozat;
- concentrarea microorganismelor (centrifugare timp de 30 minute la 3000g) înainte de însămânțare pe mediul gelozat și liza elementelor figurate cu ajutorul unui agent de liză (ex. saponină). Sistemul centrifugare-liză este folosit pentru izolarea microorganismelor fastidioase, micobacteriilor, levurilor, fungilor filamentoși.

În funcție de tipurile morfologice observate se aleg mediile de repicare a hemoculturii:

- pentru bacili Gram negativi: agar MacConkey, mediu TSI, MIU, citrat Simmons;
- pentru cocobacili Gram negativi: geloză sânge;
- pentru stafilococi: geloză sânge, agar manitol sare;
- pentru streptococi: geloză sânge cu discuri de optochin, bacitracină, telurit;
- geloză cu sânge de berbec pentru testul CAMP;
- agar bilă esculină pentru enterococi.

Bacteriile tip *Neisseria*, *Haemophilus* și *Campylobacter* modifică slab sau deloc turbiditatea, iar pneumococii suferă autoliza care antrenează clarificarea mediului lichid de cultură. În acest caz se face un pasaj orb pe geloză chocolat, la 18-24 de ore de incubare sau după 7 zile de incubare, dacă hemocultura rămâne negativă, în bulion cu tioglicolat care se urmărește timp de 3 zile.

Evidențierea bacteriilor cu creștere lentă și dificilă

Brucella. Unele tulpini sunt exigente pentru atmosfera de CO_2. Sângele este inoculat în flacon difazic tip Castaneda și incubat 6 săptămâni la 37°C.

Se fac subculturi pe geloză tripticar soia cu 5% ser de bou sau pe agar *Brucella* incubat în atmosferă de 5%CO_2.

Campylobacter. Cultivare la 37°C în microaerofilie (atmosferă 5% CO_2) pe mediu Skirrow, Butzler sau Karmali incubate 72 ore.

Legionella. Cultivare pe mediu BCYE, incubare la 37°C cu 5% CO_2, examinate timp de 10 zile.

Mycoplasme – Ureaplasma. Cultivare în bulion PPLO sau geloză A3, incubare în microaerofilie la 37°C şi observate timp de 3 zile.

Leptospira. Sânge recoltat pe heparină şi însămânţat pe mediu Tween-Albumină sau EMJH, incubare la 30°C la întuneric; examinarea săptămânală a culturii la microscopul cu fond întunecat, timp de 2 luni.

Grupul HACEK – *Haemophilus aphrophilus, Actinobacillus actinomicetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens* şi *Kingella kingae* necesită incubare timp de 14 zile.

Streptococi deficienţi (*Abiotrophia*) – necesită piridoxal (vitamina B_6) pentru creştere.

Bartonella (Rochalimaea) – sedimentul dintr-un tub de liză este însămânţat pe geloză cu sânge de iepure sau de oaie, incubată în atmosferă de 5% CO_2 timp de 6 săptămâni. Se poate identifica prin metode moleculare bazate pe PCR.

Metodele de detectare automată permit semnalizarea flacoanelor pozitive prin măsurarea directă sau indirectă a cantităţii de CO_2 produsă în flaconul de cultivare (detectare spectrofotometrică a CO_2 – **Bio Argos,** sensor de CO_2 de culoare verde, separat de bulion printr-o membrană semipermeabilă care lasă să treacă CO_2, determină scăderea valorii pH şi modificarea culorii de la verde la galben/emitere de fluorescenţă, înregistrată prin reflectometrie/fotodiodă – **BacT/Alert, Bactec 9240,** introducerea în flacoane a unor molecule care emit fluorescenţă în prezenţa fenomenelor biologice determinate de creşterea microbiană, atât producerea CO_2, cât şi variaţia pH şi modificările potenţialului oxido-reducător –**Vital).**

În endocarditele infecţioase, hemoculturile pot rămâne negative în mai mult de 10% din cazuri, chiar dacă au fost prelevate înainte de antibioterapie. În această situaţie, posibila infecţie cu *Chlamydia, Coxiella burnetti* sau *Bartonella* se poate identifica serologic. Incubarea în sistem automat de 5–7 zile este insuficientă pentru dezvoltarea tulpinilor cu creşterea lentă şi dificilă, fiind recomandată prelungirea timpilor de incubare sau repicarea flacoanelor.

În absenţa tratamentului cu antibiotice din zilele precedente, este recomandată realizarea unei prime serii de 3 hemoculturi, într-un interval de 24 ore, timpul minim dintre 2 hemoculturi fiind de o oră.

În ziua următoare, dacă hemoculturile rămân sterile, este recomandată efectuarea a 2–3 hemoculturi, diversificând mediile şi tehnicile pentru a favoriza creşterea microorganismelor fastidioase. De exemplu liza elementelor figurate permite eliberarea microorganismelor intracelulare, concentrarea şi creşterea şanselor de creştere pe medii de cultură. Acest sistem este indicat pentru izolarea levurilor, a fungilor filamentoşi şi a bacteriilor cu creştere dificilă ca *Bartonella* (*Rochalimea*). Pentru bacteriile patogene intracelulare ca *Coxiella burnetti*, tuburile pot fi trimise la centrele de referinţă.

Dacă pacientul a primit antibiotice, este recomandată utilizarea mediilor ce conţin răşini absorbante.

În cazul hemoculturilor negative este recomandat:

– începând din a 3 a zi de incubare realizarea unei colorații Gram şi a unei repicări din flacoanele aerobe şi anaerobe pe mediu gelozat "Chocolat Isovitalex", pentru cultivarea bacteriilor de grup HACEK şi pe mediu gelozat Columbia suplimentat cu 5% sânge de berbec pentru streptococi, cu striu de *S. aureus* pentru creşterea satelită a coloniilor de *Str. adjacens* şi *Str. defectivus*.

Mediile se incubează 2–5 zile în atmosferă de CO_2 pentru mediile repicate din flacoanele aerobe şi în condiţii de anaerobioză pentru cele repicate din flacoanele anaerobe. Poate fi realizată o subcultură pe mediu lichid, de exemplu, pe bulion cord-creier, iar în a 7-a zi de incubare se poate realiza o colorație Gram şi o repicare pe mediu gelozat "Chocolat Isovitalex", pentru creşterea bacteriilor de grup HACEK, incubat timp de 5 zile în atmosferă de 5–10 % CO_2 sau în anaerobioză, în funcţie de flaconul de origine.

Dacă hemoculturile sunt negative la 3 zile de la incubare, pentru *Chlamydia psittaci, Chl. pneumoniae, Chl trachomatis, Brucella, Legionella, Mycoplasma pneumoniae, Bartonella, Candida, Aspergillus, Coxiella burnetii* este recomandat examenul serologic.

Pentru diagnosticul endocarditelor se poate realiza analiza microbiologică a valvelor cardiace. În acest scop, valva va fi recoltată într-un vas steril care nu conține nici un lichid și va fi transmisă laboratorului. Valva este depusă într-un mojar sau alt vas steril, se examinează macroscopic, se fotografiază, după care se realizează 3 amprente pe lamă. Lamele sunt uscate și fixate cu etanol. Se poate efectua colorație Gram, Ziehl-Neelsen, Giemsa sau acridin-orange. Aceste colorații permit punerea în evidență a majorității bacteriilor, inclusiv a micobacteriilor. Fragmentul destinat anatomopatologului poate fi plasat într-un fixator (formol diluat 1/10). Fragmentul destinat bacteriologului este mojarat într-un ml bulion creier-cord. Din amestec se realizează un frotiu colorat Gram și se însămânțează pe:

- geloză-chocolat suplimentată cu Isovitalex, care se incubează în atmosferă de 5% CO_2 (sau sistem Gaspak) timp 10 zile. Pentru a rezista la desicare mediul se poate repartiza înclinat în tub;
- geloză-chocolat suplimentată cu Isovitalex, care se incubează în atmosferă de 5% CO_2, timp de 45 de zile între 28–32^{0}C pentru a favoriza creșterea *Bartonella;*
- 2 medii gelozate cu 5% sânge incubate una în atmosferă de O_2, alta în atmosferă de 5% CO_2 timp de 10 zile pentru streptococi. Aportul de CO_2 favorizează creșterea *Str. mutans, S. anginosus* și *S. constellatus;*
- mediu geloză Columbia cu 5% sânge cultivat timp de 10 zile în anaerobioză pentru creșterea unor streptococi și bacterii anaerobe;
- geloză BCYE suplimentată cu 10% ser fetal bovin incubat în atmosferă de CO_2 la 35–37°C timp de 10 zile (serul fetal bovin favorizează creșterea *Legionella micdadei* și *L. bosemanii*);
- mediul Lowenstein și Middlebrook conservat 6 săptămâni la 35–37°C pentru cultivarea micobacteriilor;
- un mediu lichid ușor reducător, îmbogățit și ușor gelozat (de exemplu, mediul cord-creier, gelozat 1% și îmbogățit cu 1–3% Isovitalex/ bulion glucozat tamponat cu ficat și îmbogățit cu 1–3% Isovitalex, mediu Schaedler semigelozat îmbogățit cu 1–3% Isovitalex). Aceste medii sunt incubate timp de o lună la 35–37°C.

15.9. Examenul bacteriologic al dispozitivelor intravasculare (catetere, camere implantabile)

Inserția cateterelor cardiovasculare are drept obiective asigurarea unui acces vascular permanent pentru administrarea medicamentelor și a soluțiilor parenterale, măsurarea unor parametri hemodinamici și accesul la diferite situsuri anatomice.

Inserția cateterelor prin piele expune aceste dispozitive la riscul colonizării cu microorganisme ale microbiotei cutanate rezidente, care pot iniția o infecție asociată dispozitivului protetic. Examenul bacteriologic al acestor dispozitive este justificat în cazul unor infecții generalizate și/sau localizate și are ca obiective:

- evidențierea colonizării microbiene a unui cateter (tabelul 49);
- diferențierea unei colonizări de contaminarea ce are loc în general la scoaterea dispozitivului (tabelul 50): se poate recurge la metode cantitative, semicantitative sau calitative (care constau în imersarea dispozitivului în medii de cultură lichide);
- documentarea unei stări septice: se realizează sistematic hemoculturi periferice pentru evidențierea bacteriemiei și pentru excluderea unui alt focar infecțios în afara cateterului colonizat;
- luarea unei decizii privind instaurarea unui tratament local sau general cu un anumit antibiotic sau îndepărtarea cateterului.

Microorganismele cel mai frecvent întâlnite sunt reprezentate de rezidenți ai microbiotei normale: *S. epidermidis* (și alți stafilococi coagulazo-negativi), *S. aureus, Ps. aeruginosa, Acinetobacter ssp., enterobacterii, Enterococcus ssp.*, bacterii corineforme, *Candida sp.* Studiul bacteriilor anaerobe nu este necesar în acest context.

Tabelul 49.

Metode de analiză bacteriologică a dispozitivelor intravasculare *in situ*

Metoda centrifugare-liză (Isolator 10)	Metoda liza Isolator 1,5	Hemocultura în sistem automat
Se recoltează 2 hemoculturi (10 ml de sânge fiecare), prima de la periferie, la distanță de dispozitiv și a doua de la nivelul acestuia (după îndepărtarea primilor 20 ml de sânge). Însămânțarea sedimentului rezultat după centrifugare din fiecare tub, pe 2-3 placi cu geloză sânge. Incubare timp de 72 ore în atmosferă cu 5% CO_2. Numărarea coloniilor (UFC/ml). Rezultatul este semnificativ dacă nr. UFC/ml obținut din cateter > 5x nr. UFC/ml obținut din sângele periferic.	Aceleași etape; fără centrifugare; volume mai mici de 1,5 ml; se utilizează în pediatrie.	Se recoltează 2 hemoculturi (10 ml de sânge fiecare), prima de la periferie, la distanță de dispozitiv și a doua de la nivelul acestuia (după îndepărtarea primilor 20 ml de sânge). Probele se plasează în automat. Se notează momentul pozitivării celor 2 hemoculturi prelevate de pe material. Rezultatul este semnificativ dacă timpul de pozitivare al hemoculturii recoltate de pe cateter este mai mic decât cel al hemoculturii periferice.

Tabelul 50.

Metode de analiză bacteriologică a dispozitivelor intravasculare după scoaterea din organism

Se lucrează pe fragmente de 5 cm provenite de la extremitatea distală pentru cateterele lungi, sau pe toată lungimea cateterului pentru cateterele scurte.			
Metoda semicantitativă Maki	Metoda cantitativă Cleri	Metota cantitativă Cleri modificată (Brun Buisson)	Analiza bacteriologică după scoaterea unei camere implantabile
Se rulează cateterul pe suprafața unei plăci de geloză-sânge sau de mediu lactozat cu ajutorul unei pense sterile sau al unei pipete Pasteur (fig. 348); – incubare 48 ore la 37°C. Cateterul este colonizat dacă nr. UFC/ml > 15 (5 după unii autori) Colonizarea se raportează exclusiv la suprafața externă a cateterului. Prezintă sensibilitate bună, dar specificitate redusă.	Se prinde cateterul cu o pensă sterilă și se repartizează prin orificiul său 1 ml de bulion steril; – se colectează bulionul și cateterul într-un tub steril; – vortexare 30 secunde; – însămânțare 10 µl bulion pe geloză sânge; – incubare 48 ore la 37°C. Cateterul este colonizat dacă nr. UFC /ml >1000. Colonizarea se raportează la suprafața externă a cateterului și la orificiul dispozitivului. Prezintă sensibilitate și specificitate bune.	Cateterul este colectat în 1 ml ser fiziologic steril; – vortexare 1 minut. Se obține același prag de pozitivitate ca în metoda precedentă.	Se recoltează serozitățile de la nivelul camerei îndepărtate din organism; – se analizează cateterul printr-o metodă cantitativă (Cleri sau Brun-Buisson); – se spală partea închisă a camerei și se analizează lichidul de spălare printr-o metodă cantitativă (Cleri sau Brun-Buisson).

Fig. 348. Cultura crescută prin rularea unui cateter colonizat cu bacterii Gram negative, lactozăfermentative (CLED).

15.10. Examenul citochimic și bacteriologic al lichidului cefalorahidian (LCR)

Examenul de laborator al LCR ajută la diagnosticul precoce al meningitei (tabelul 51) și la orientarea tratamentului. Analiza LCR are caracter de maximă urgență și prioritate.

Meningitele se pot clasifica în: meningite comunitare (ambulatorii) – stratificate pe 3 niveluri de vârstă (adulți și copii > 5 ani, sugari și copii < 5 ani, nou-născuți) și meningite nosocomiale (care survin la pacienții imunodeprimați sau cu intervenți neurochirugicale, fiind favorizate de un traumatism).

Tabelul 51.

Etiologia meningitelor

Meningite comunitare	Adulți și copii > 5 ani	Sugari și copii < 5ani	Nou-născuți
	Str. pneumoniae *N. meningitidis* *L. monocytogenes*	*Str. pneumoniae* *N. meningitidis* *H. influenzae*	*Str. agalactiae* *E. coli* *L. monocytogenes*
Meningite neurochirugicale	*S. aureus* sau *S. epidermidis* *Str. pneumoniae* *Enterobacteriaceae* *Pseudomonas* sp.		

Examenul macroscopic și citochimic al LCR (tabelele 52, 53) permite orientarea diagnosticului spre o etiologie bacteriană sau virală. Formula leucocitară nu se poate realiza pe un preparat ce conține sub 10 elemente celulare/mm^3 și este dificil de realizat sub 20 elemente celulare/mm^3.

BCU IAȘI - FONDUL CENTRAL UNIVERSITAR

Tabelul 52.

Tipuri de LCR în funcție de caracteristicile macroscopice, citologice și biochimice.

LCR normal	LCR "tulbure"	LCR limfocitar	LCR "franc purulent"	LCR hemoragic
Aspect macroscopic "apa de stâncă" (limpede). Sub 5 elemente/ mm^3 (NB: la nou-născuți 10–30 elemente/mm^3 (50% polinucleare neutrofile). Proteinorahie normală (mai mică 0.4g/l) și glicorahie normală (mai mică de 60% față de glicemie).	Aspectul macroscopic orientează spre o meningită purulentă (200 leucocite/mm^3). Mai mult de 10 elemente/ mm^3 din care 50% polinucleare. Proteinorahie mai mare de 0.4 g/l – hipoglicorahie mai mică de 40% față de glicemie.	Mai mult de 10 elemente/ mm^3 din care 50% limfocite. Proteinorahie mai mică de 0.4 g/l. Hipoglicorahie însoțită de hipoclorurorahie (mai mică de 40% față de glicemie: se suspectează etiologie bacteriană cu *Listeria*, BK) dacă glicorahia este mai mare de 50% decât glicemia și mai puțin de 100 elemente/mm^3: se suspectează etiologie virală.	Mai mult de 10 elemente/mm^3; procente egale de polinucleare și limfocite. Proteinorahie și glicorahie normale. Se poate suspecta: listerioza, meningita purulentă sau o meningită limfocitară la debut, abces cerebral	Contaminarea LCR cu hematii se poate datora unui traumatism apărut în timpul puncției lombare sau unei hemoragii subarahnoidiene (asociată unei pleiocistoze și uneori cu hipoglicorahie). Proteinorahie = 0.1 g/l.

LCR trebuie transportat rapid la laborator (< 30 min), deoarece polinuclearele se lizează rapid (50% în 2h), iar bacteriile sensibile își pierd viabilitatea (de exemplu, meningococul), însoțit de date clinice: vârsta, dignosticul prezumtiv, tratamente cu antibiotice administrate anterior recoltării.

Tabelul 53.

Principalele caracteristici citologice, biochimice și microscopice ale LCR în funcție de etiologia meningitei (WHO, 2003).

Parametrul	Tipul de meningită			
	Bacteriană	Tuberculoasă	Fungică	Virală
Formulă leucocitară modificată cu predominanță:	PMNN	Mononucleare PMNN – stadii inițiale de dezvoltare.	Mononucleare	Mononucleare
Glucoza	Foarte scăzută 0.28–1.1mmol/l	Scăzută: 1.1–2.2mmol/l	Scăzută: 1.1–2.2mmol/l	Normală: 3.6–3.9 mmol/l
Proteinorahie	Ridicată	Ridicată	Ridicată	Ușor ridicată în stadiile inițiale ale infecțiilor.
Frotiu	Bacterii observate la colorația Gram.	Rareori pozitiv (colorația Ziehl Neelsen).	Pozitiv (Colorație cu tuș de China).	Negativ.

Formula leucocitară se realizează din sedimentul obținut după centrifugare în tuburi conice sterile, cu ajutorul unei camere de numărare, urmată de o colorație May-Grunwald-Giemsa sau eozină-albastru de metilen.

Examinarea frotiurilor colorate Gram permite orientarea rapidă a diagnosticului etiologic (prezența de coci, bacili, Gram +/– (fig. 349), prezența capsulei, localizarea intra-/extraleucocitară), corelată cu investigarea prezenței antigenelor solubile în LCR prin metoda latex-aglutinarii.

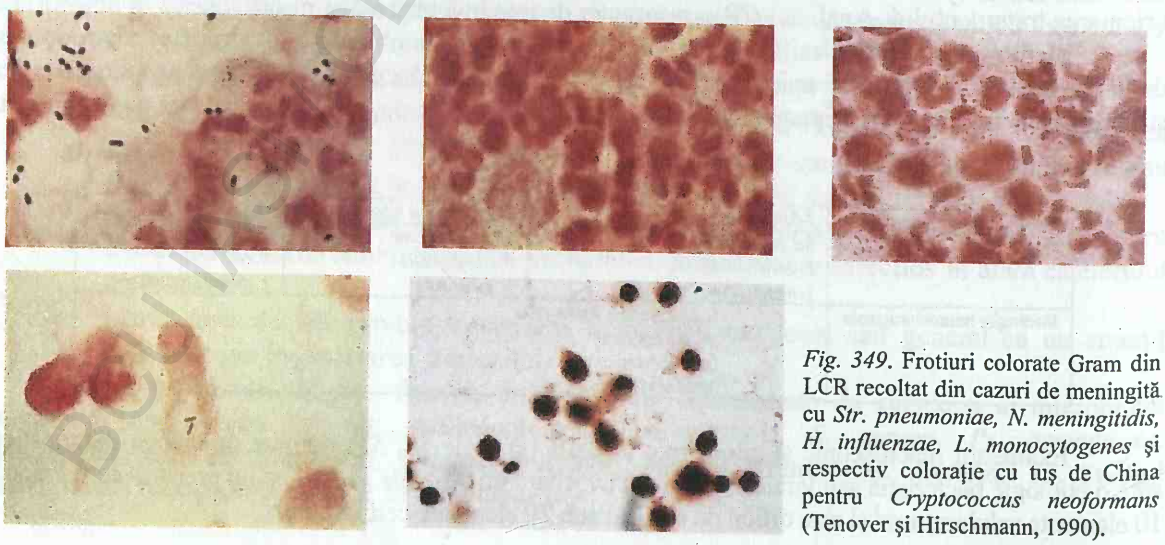


Fig. 349. Frotiuri colorate Gram din LCR recoltat din cazuri de meningită cu *Str. pneumoniae, N. meningitidis, H. influenzae, L. monocytogenes* și respectiv colorație cu tuș de China pentru *Cryptococcus neoformans* (Tenover și Hirschmann, 1990).

BCU "SPIRU HARET" UNIVERSITY LIBRARY

Diagnosticul orientativ rezultat după examinarea microscopică, biochimică şi serologică este transmis urgent clinicianului.

Evidenţierea bacteriilor dupa coloraţia Gram permite realizarea unei antibiograme utilizând ca inocul direct LCR (dacă este în cantitate suficientă).

Cultivarea

LCR se însămânţează pe medii îmbogăţite care permit creşterea bacteriilor cu exigenţe nutritive: geloza sânge (pentru *Listeria,* coci Gram pozitivi) sau geloza sânge suplimentată cu factori de creştere, geloză sânge cu striu de *S. aureus* (pentru *H. influenzae),* cu disc de optochin (pentru *Str. pneumoniae*) incubate la 37°C în atmosferă de 5–10% CO_2, medii pentru anaerobi, incubate la 37°C în anaerobioză, bulion cu extract globular (facultativ) ce permite diluarea antibioticului prezent în LCR, geloza Sabouraud (în meningita limfocitară la imunodeprimaţi SIDA), mediu MacConkey (pentru enterobacterii şi alţi bacili Gram negativi fără exigenţe nutritive).

Mediile vor fi observate după 18–48 ore de incubare la 37°C şi timp de 5 zile.

Examinarea morfologiei coloniilor, afinităţii tinctoriale pentru coloranţii Gram, testul oxidazei şi catalazei permit orientarea diagnosticului şi alegerea galeriei de identificare, a tehnicilor de testare a antibiosensibilităţii şi a metodelor de tipizare. Pentru bacilii Gram negativi şi *S. aureus,* se realizează antibograma. În cazul *H. influenzae* se recomandă investigarea β-lactamazelor, pentru *N. meningitidis* investigarea β-lactamazelor care poate apărea în cazuri excepţionale, investigarea sensibilităţii scăzute la penicilina G prin măsurarea diametrului zonei de inhibiţie în jurul discului de oxacilină şi prin determinarea CMI, serogruparea, trimiterea către un centru de referinţă, pentru *Str. pneumoniae* detectarea rezistenţei la β-lactamice cu ajutorul discului de oxacilină şi determinarea CMI la penicilina G, amoxicilină, cefotaxim şi ceftriaxonă (fig. 350). Pentru *L. monocytogenes* şi *Str. agalactiae* nu se recomandă antibiograma, datorită conservării sensibilităţii acestora la benzil-peniciline.

În cazul unui LCR limfocitar cu hiperproteinorahie, hipoglicorahie şi hipoclorurahie se suspectează o meningită tuberculoasă şi se urmăreşte investigarea BAAR prin examen microscopic, însămânţarea pe medii de cultură specifice pentru *M. tuberculosis* şi confirmare moleculară.

Creşterea pe medii de cultură poate rămâne negativă în cazul unei meningite purulente aseptice, rezultat ce se poate datora unui tratament cu antibiotice sau unei etiologii bacteriene cauzate de o bacterie fastidioasă.

În cazul aspectului şi biochimiei normale a LCR, prezenţa cîtorva colonii izolate de coci Gram pozitivi sugerează o contaminare a LCR în momentul prelevării. Totuşi, aceste colonii se vor identifica şi se vor raporta.

Pe baza indicaţiilor clinice, se vor realiza examinări complementare privind investigarea prezenţei unor amoebe libere (*Naegleria fowleri*) sau a unor protozoare flagelate (*Tripanosoma*) prin microscopie cu contrast de fază sau pe frotiu colorat Giemsa, examinarea preparatului proaspăt cu tuş de China pentru evidenţierea capsulei la *Cryptococcus neoformans,* detectarea prin amplificare genică a bacteriilor cu creştere lentă: *M. tuberculosis, Leptospira, Borelia.*

Fig. 350. Testul sensibilităţii la optochin la *Str. pneumoniae*, antibiograma difuzimetrică, şi determinarea CMI la penicilină prin E-test.

15.11. Examenul bacteriologic al lichidelor de puncţie (lichide purulente, serozităţi)

Contaminarea microbiană a lichidelor interne (lichid de puncţie articulară sau sinovială, lichid pleural, lichid peritoneal, lichid de ascită, lichid pericardic, chisturi tegumentare) care în mod normal sunt sterile, determină infecţii cu un nivel ridicat de morbiditate şi mortalitate.

În consecinţă, metodele de izolare şi caracterizare a speciilor bacteriene izolate din aceste situri trebuie să fie performante, rapide şi eficiente, în vederea instituirii cât mai rapide a unui tratament ţintit.

Bacteriile izolate din aceste infecţii pot fi aerobe, facultativ anaerobe sau strict anaerobe (tabelul 54).

Tabelul 54.

Etiologia infecţiilor cavităţilor sterile ale organismului.

Supuraţie hepatică	*Enterobacteriaceae* Anaerobi *Str. "milleri"* *S. aureus* *Enterococcus* sp.
Peritonita primară	*Str. pneumoniae* *E. coli*
Peritonita secundară (infecţie biliară sau abces)	*Enterobacteriaceae* Streptococi Anaerobi *Enterococcus* spp.
Supuraţie intestinală	*Yersinia pseudotuberculosis* *Y. enterocolitica* *Salmonella* spp *Str. "milleri"*
Peritonita post-chirurgicală	*Enterobacteriaceae* *Enterococcus* spp Anaerobi
Pleurezie	*Str. pneumoniae* *S. aureus* *H. influenzae* Anaerobi
Osteomielita la copil	*S. aureus*
Osteomielita şi spondilodiscita	*S. aureus* *Enterobacteriaceae* *Ps. aeruginosa*
Artrita profundă	*S. aureus* *N. gonorrhoeae* *Enterobacteriaceae* *Streptococcus* spp. *H. influenzae* *Borrelia burgdorferi* *Ps. aeruginosa*
Infecţii ale protezelor articulare	*S. aureus* Stafilococi coagulază-negativi *Peptostreptococcus.*

Prelevarea şi transportul probelor (tabelul 55)

Tabelul 55.

Metode de recoltare şi transport al lichidelor de puncţie

Produs patologic	Prelevare	Transport	Observaţii
Lichide interne (pericardic, pleural, abdominal, articular, de puncţie).	Condiţii anaerobe: cu seringa, fără bulă de aer şi ermetic (≥ 3ml), într-un tub steril pentru examenul bacteriologic sau într-un tub cu anticoagulant pentru examenul citologic. Este necesară recoltarea în condiţii aseptice pentru a evita contaminarea probelor cu microbiotă comensală. Uneori lichidul recoltat poate fi utilizat.	Mai scurt de 30 min., la 20°C. Pentru investigarea gonococului se foloseşte ca mediu de transport geloza Stuart.	Hemoculturile se prelevează înainte de tratamentul cu antibiotice. Trebuie obţinută o cantitate suficientă, deoarece densitatea inoculului poate fi redusă. Dacă volumul de lichid recoltat este mic, acesta se inoculează direct într-un flacon de hemocultură.

Examenul direct:

- în situaţia unei cantităţi mici de lichid (sau în cazul puncţiei chiştilor) se realizează un frotiu colorat Gram;
- în situaţia unei cantităţi suficiente de lichid se realizează un frotiu colorat Gram şi formula elementelor figurate.

Cultivarea

- concentrarea probei prin centrifugarea lichidelor interne la 1500g / 30 minute (prin expunere la O_2 există riscul distrugerii anaerobilor şi al contaminării probei);
- însămânţare în:
  * bulion îmbogăţit (tip cord – creier), incubare în anaerobioză la 37°C (în medie 4 zile, iar pentru lichidele articulare 10 zile), cu observare zilnică;
  * bulion pentru anaerobi şi geloză sânge incubată în anaerobioză;
  * geloza sânge, mediu selectiv pentru bacterii Gram negative, geloza chocolat incubată în atmosferă de CO_2 la 35°C;
  * în funcţie de context:
    - geloza BCYE pentru *Legionella;*
    - mediu cu Tween pentru corinebacterii;
    - mediu Sabouraud pentru levuri, *Aspergillus* (incubare la 22–30°C);
    - mediu pentru *Mycobacterium* (incubare 8 săptămâni);
    - mediu de cultură pentru *Nocardia* (10 zile).

Interpretarea creşterii presupune analiza comparativă a rezultatelor obţinute prin cultivare în aerobioză şi respectiv, anaerobioză. Mediile solide sunt examinate la 24h şi 48h. Mediile lichide sunt incubate timp de minimum 10 zile (pozitivarea culturii demonstrează existenţa unei infecţii, dar absenţa culturii se poate datora existenţei bacteriei în cantităţi reduse/necultivabile în produsul recoltat).

Prezenţa unei culturi mixte (>3 specii microbiene, nici unul nefiind predominant) impune identificarea tuturor speciilor izolate, realizându-se o corelaţie cu simptomatologia pacientului.

Se recomandă realizarea antibiogranei pentru speciile izolate şi determinarea valorii CMI pentru moleculele folosite frecvent în tratamentul acestor infecţii.

15.12. Analiza microbiologică a exsudatelor purulente, a secreţiilor de plagă şi a abceselor

Unul dintre procesele cele mai frecvent asociate bolilor infecţioase este producerea unei secreţii purulente (uneori seropurulente) ca rezultat al invaziei bacteriene într-o cavitate, ţesut sau organ (tabelul 56). Exsudatul este format din leucocite, predominant polimorfonucleare, microorganisme, limfă şi fibrină.

Comunicarea între clinician şi microbiolog este deosebit de importantă în diagnosticul şi tratamentul pacienţilor cu infecţii supurative. Microbiologul trebuie să colaboreze cu medicul pentru a asigura prelevarea corectă a produsului patologic şi transportul rapid la laborator. Dacă este posibil, tampoanele de bumbac ar trebui să fie evitate.

Tabelul 56.

Etiologia infecţiilor supurative cu diferite localizări

Situsul anatomic	Etiologii posibile	Produs patologic
Cavitatea peritoneală	Bacterii Gram negative enterice Enterococi Bacili Gram negativi anaerobi (*Bacteroides fragilis*) Clostridii.	Produs recoltat chirurgical
Abcese închise	Coci Gram pozitivi Bacili Gram negativi Bacterii anaerobe Amoebe	Puroi recoltat chirurgical sau prin puncţionare cu seringa
Abcese fesiere la locul injectării profunde intramusculare a preparatelor injectabile.	*Mycobacterium fortuitum-chelonei*	
Ganglioni limfatici.	*Mycobacterium tuberculosis* Alte micobacterii Stafilococi Streptococci Enterobacterii Micoze sistemice sau cutanate (histoplasmoza, sporotricoza)	Biopsii, aspirate
Abcese subcutanate	Streptococci Stafilococi	
Ulcer de decubit	Enterobacterii	Exsudate recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril Biopsie
Ulcere cutanate	M. ulcerans M. marinum	

Arsuri de gradul II şi III	*Ps. aeruginosa* Stafilococi	Exsudate recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril
Plăgi traumatice, împuşcate, înjunghiate, muşcături de animale, zgârieturi	*Cl. tetani* *Cl. botulinum* *B. anthracis* *Pasteurella multocida*	Secreţii plagă recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril
Plăgi operatorii	*S. aureus* *E. coli* *Bacteroides fragilis* *Cl. perfringens*	Secreţii plagă, lichid de drenaj recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril
Infecţii postoperatorii (intervenţii chirurgicale stomatologice, ORL)	Actinomicoza (puroi cu aspect de granule de sulf)	Secreţii plagă, lichid de drenaj recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril

Examinarea macroscopică

Se examinează aspectul leziunii, prezenţa gazului, culoarea puroiului care variază de la verde-galben la maro-roşu (sânge sau hemoglobină). Aspiratul dintr-un abces primar hepatic amoebian are o consistenţă gelatinoasă şi culoare maro închis gălbui. Puroiul din rănile postoperatorii sau traumatice poate fi albastru-verde datorită pigmentului piocianină produs de *Ps. aeruginosa.*

Consistenţa puroiului poate varia de la lichid tulbure la una foarte vâscoasă şi lipicioasă. Puroiul provenit din sinusuri trebuie inspectat pentru prezenţa granulelor galbene, mici, cu aspect de "sulf", care sunt formate de filamentele de *Actinomyces israelii.* Prezenţa granulelor mici de diferite culori (alb, negru, roşu, sau maro) este tipică pentru micetom şi tumori granulomatoase. Puroiul din leziunile TBC are consistenţă cazeoasă. Mirosul neplăcut, fetid, este revelator pentru infecţii cu bacterii anaerobe sau pentru infecţiile mixte aerobe-anaerobe.

Examinarea microscopică

Examinarea frotiurilor colorate Gram este obligatorie. În cazuri speciale, sau la cererea clinicianului, se examinează frotiuri colorate Ziehl-Neelsen.

Frotiurile se fac prin prelevare cu ansa a materialului reprezentativ sau prin descărcarea uşoară a tamponului fără presare excesivă sau frecare.

Se examinează:

- prezenţa şi cantitatea (apreciere semicantitativă +, ++, +++, ++++) următoarelor componente:
- granulocitele polimorfonucleare;
- coci Gram pozitivi aranjaţi în grămezi – stafilococi;
- coci Gram pozitivi în lanţuri – streptococi sau enterococi;
- bacili Gram negativi (*E. coli, Klebsiella, Proteus, Serratia, Pseudomonas spp, Bacteroides* spp.);
- bacili mari, drepţi, Gram pozitivi cu capete pătrate – *Cl. perfringens, B. anthracis*;
- microbiotă mixtă anaerobă;
- *Candida* sau alte levuri, pseudofilamente sau filamente miceliene.

La cerere se poate executa şi un preparat proaspăt lamă/lamelă în KOH 10% în cazul suspiciunii unei infecţii fungice sau parazitare.

Însămânţarea produselor patologice

Se însămânţează o buclă de ansă sau câteva picături de produs patologic pe:

- placă de geloză sânge pentru izolarea de stafilococi şi streptococi;
- placă de agar MacConkey pentru izolarea bacteriilor Gram negative;
- un tub de bulion, care poate servi ca mediu de îmbogăţire atât pentru aerobi, cât şi pentru anaerobi (de exemplu, bulion tioglicolat);
- agar manitol pentru streptococci;
- disc de bacitracină pentru *Str. pyogenes;*
- agar Sabouraud pentru fungi;
- mediu Löwenstein-Jensen pentru probele BAAR pozitive;
- puroiul de la pacienţii cu artrită, pleurită, osteită, sau celulită, în special de la copiii sub 5 ani, este inoculat pe o geloză chocolat pentru izolarea *H. influenzae*;

– incubarea plăcilor la 35°C, în exicator sau în anaerobioză strictă dacă aspectul microscopic este de microbiotă mixtă anaerobă, timp de minimum 48 de ore şi maximum 1–2 săptămâni.

Dacă se obţine creştere doar în bulionul de îmbogăţire, frotiurile colorate Gram vor orienta alegerea mediilor de cultură folosite pentru repicare. Din fiecare tip de colonie se face un frotiu şi se colorează Gram, care se examinează microscopic.

Stafilococii formează pe geloză – sânge colonii opace, alb-crem, cu diametrul de 1–2 mm, catalază pozitive. Speciile de stafilococ de importanţă medicală, *S. aureus, S. epidermidis* şi *S. saprophyticus* se diferenţiază pe baza testului coagulazei, acidifierii manitolului, producerii de pigment şi sensibilităţii la novobiocină.

Pasteurella multocida se prezintă sub forma unor cocobacili foarte mici, Gram negativi, imobili care se dezvoltă bine pe geloză sânge la 35°C, dar este complet inhibată de săruri biliare conţinute de agarul MacConkey. După incubare peste noapte, formează pe geloză sânge colonii mici, nehemolitice, translucide şi mucoide. Fermentează glucoza fără producere de gaz, este slab pozitivă pentru reacţia oxidazei, catalază pozitivă, reduce nitraţii la nitriţi, este ureazo-negativă, indol-pozitivă.

Bacillus anthracis este un bacil aerob, sporulat, Gram pozitiv care produce pe geloză sânge colonii mari, plate, gri, de până la 5 mm în diametru, cu o textură rugoasă şi margini neregulate, cu aspect de cap de meduză. Spre deosebire de alte specii saprobionte, este nehemolitic, foarte sensibil la benzilpenicilină şi imobil.

Administrarea substanţelor antimicrobiene nu este suficientă pentru tratamentul infecţiilor supurative, tratamentul chirugical (incizie, drenaj şi debridare) fiind, în general, mai important. Testarea sensibilităţii la antibiotice nu este necesară pentru microrganismele cu sensibilitate la peniciline, cum sunt streptococii, *Pasteurella* şi *Actinomyces*, dar se recomandă pentru *Enterobacteriaceae*, bacili Gram negativi non-fermentativi şi stafilococi.

15.13. Examenul bacteriologic al lichidului de dren

Analiza bacteriologică a unui lichid de dren se poate practica în scopul supravegerii unui situs în mod natural steril. Această practică este curentă, dar nevalidată clinic, fiind de un interes discutabil. Abordarea permite analiza produselor recoltate din sisteme de drenaj închise, diferenţierea colonizării dispozitivului de contaminarea ce are loc la situsul de inserţie sau pe traseul drenului (prin analiza comparativă calitativă şi cantitativă a microbiotei obţinute cu cea de la nivelul situsului de colectare).

Dacă proba este pozitivă trebuie demonstrată natura infecţiei: localizată sau generalizată (în acest ultim caz hemoculturile sunt pozitive).

Lichidele de dren se examinează direct pe frotiuri colorate Gram realizate din produsul patologic sau după concentrare prin centrifugare şi se însămânţează pe geloză-sânge incubată în aerobioză. Antibiograma nu este obligatorie.

15.14. Examenul bacteriologic al prelevatelor oculare

Scopul analizei microbiologice a acestor produse (tabelul 57) este diagnosticul etiologic al infecţiilor oculare prin izolarea agentului etiologic şi prevenirea infecţiilor post-operatorii prin studiul microbiotei conjunctivale.

Infecţiile oculare pot afecta diferite structuri ale ochiului, fiind localizate la nivelul segmentului anterior: conjunctivite, keratite (supurative, micotice), uveite anterioare/iridociclite; posterior: corioretinite, retinite, endoftalmite, panoftalmite sau pot fi infecţii perioculare.

Etiologia infecţiilor oculare poate varia în funcţie de vârstă, status imunitar (imunodeficienţă) şi zona geografică.

Examenul pre-operator previne apariţia infecţiilor postoperatorii cu bacterii comensale sau patogene prezente în microbiota conjunctivală (tabelul 58). Microbiota normală conjunctivală cuprinde: stafilococi coagulazo-negativi ~94%, corinebacterii, neisserii nepretenţioase, streptococi, hemofili, fungi saprobionţi, *S. aureus*. Infecţiile pre-operatorii sunt produse în proporţie de 25–30% de bacterii patogene, cele mai frecvente fiind cele Gram pozitive (75–80%) (tabelul 59).

Tabelul 57.

Recoltarea şi transportul produselor oculare (adaptat după REMIC, 2008; Buiuc şi Neguţ, 2009).

Tipuri de infecţii	Momentul prelevării	Recoltarea probelor	Transportul probelor
Prelevate conjunctivale	Pre-operator, înainte de intervenţia chirugicală. Pentru diagnostic, înainte de toaleta locală	Cu tampoane umectate în ser fiziologic steril sau micropipete de pe suprafaţa conjunctivei si/sau din unghiul intern al ochiului Se recoltează cel puţin 2 tampoane (pentru frotiu şi însămânţări)	Transport: ≤2 h la temperatura camerei. În cazul în care examinarea prelevatelor nu se poate realiza imediat se folosesc medii de transport: mediu pentru *Chlamydia*, mediu Stuart pentru alte specii bacteriene
Blefarite		1–2 cruste palpebrale, cu pensa sterilă	
Orgelet		Puroiul se prelevează cu un ac de seringă steril.	
Dacriocistită (inflamaţia glandelor lacrimale, cu obstrucţia canalelor lacrimale)		Puroiul se prelevează de la nivelul glandelor lacrimale palpebrale, prin presarea sacilor lacrimali	
Ulcer corneean		Cu tampon după efectuarea unei anestezii locale.	

Examenul direct

Nu se realizează pentru produsele recoltate pre-operator !

Pentru produsele recoltate în scopul diagnosticului unei infecţii:

1. frotiu colorat Gram – permite descrierea microbiotei dominante;
   - o absenţa microorganismelor pledează pentru o etiologie virală (adenovirusuri, virusuri herpetice, virusul Epstein Barr);
   - frotiu colorat Giemsa – permite descrierea aspectelor citologice (prezenţa polimorfonuclearelor);
   - imunofluorescenţă pentru evidenţierea bacteriei *Chl. trachomatis*;
   - preparat proaspăt pentru evidenţierea amoebelor libere la pacienţii purtători de lentile de contact.

Cultivare

În contextul general se utilizează geloza sânge/ chocolat incubată în atmosferă de CO_2, la 35°C.

În contexte clinice şi epidemiologice particulare:

- culturi de celule pentru izolarea *Chl. trachomatis;*
- bulion /geloză sânge incubate în anaerobioză;
- mediu Sabouraud pentru levuri şi *Aspergillus*, incubare la 22–30°C;
- medii de cultură specifice pentru *Mycobacterium* şi *Nocardia* (incubare 8 săptămâni în atmosferă de CO_2 la 35°C);
- medii de cultură pentru amoebe libere.

Antibiograma

Atât în cazul produselor recoltate pre-operator, cât şi în cazul celor recoltate în scop diagnostic, antibiograma se realizează numai pentru bacteriile cu potenţial patogen (tabelul 58).

Tabelul 58.

Principalele specii bacteriene cu potenţial patogen izolate din prelevatele conjunctivale pre-operatorii (REMIC; 2008).

Bacterii Gram pozitive	Potenţial patogene	*S. aureus, Str. pneumoniae, Enterococcus faecalis*
	Comensale	*S. epidermidis, Corynebacterium* sp. *Propionibacterium acnes, Streptococcus* spp. Predomină la pacienţi imunodeprimaţi
Bacterii Gram negative	Potenţial patogene	Enterobacterii (*Serratia, Klebsiella, Proteus, Enterobacter*), *Ps. aeruginosa, Haemophilus, Moraxella, Acinetobacter.* Predomină la purtătorii de lentile de contact
	Comensale	*Moraxella catarrhalis, Neisseria* spp.

Tabelul 59.

Principalii agenţi etiologici ai infecţiilor oculare (adaptat după REMIC, 2008; Buiuc şi Neguţ, 2009).

Localizare	Context general	Context particular
Conjunctivita (Inflamaţia conjunctivei)	*S. aureus, Str. pyogenes, Str. pneumoniae, H. influenzae, N. gonorrhoeae, Moraxella* spp., enterobacterii	Adult imunodeprimat: *Pseudomonas*, enterobacterii, levuri. Persoane vârstnice şi copii: *N. gonorrhoeae, S. aureus, Str. pyogenes, Chl. trachomatis, Ps. aeruginosa.* Africa şi ţări în curs de dezvoltare: *M. tuberculosis, C. diphtheriae, N. gonorrhoeae, Haemophilus aegyptius, Chl. trachomatis* (trachom-serotipurile A, B şi C şi conjunctivită cu incluzii – serotipurile D şi K).
Celulite profunde (inflamaţia tegumentului şi a ţesutului subcutanat adiacent cu localizare periorbitară)	*S. aureus, Str. pyogenes, Str. pneumoniae, Ps. aeruginosa*	Copii <5ani : *H. influenzae* Imunodeprimaţi sau diabetici: bacterii anaerobe şi levuri
Celulite cronice	*S. aureus, Str. pyogenes, Str. pneumoniae, Ps. aeruginosa, Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces, Aspergillus*	
Dacrioadenite şi dacriocistite	Profunde: *S.aureus, S. pyogenes, S. pneumoniae, H.influenzae*	Cronice: *M. tuberculosis, M. leprae Nocardia, T. pallidum*, levuri.
Canaliculite (infecţii cronice ale orificiului lacrimal şi ale canalelor lacrimale).	*Propionibacterium propionicus*	
Blefarite (inflamaţia marginii libere a pleoapelor)	*S. aureus, S. epidermidis*, uneori *Moraxella* spp.	Demodex
Keratite (inflamaţia corneei)	*S. aureus, Str. pneumoniae, Ps. aeruginosa, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, Proteus*, uneori micobacterii atipice, levuri, *Aspergillus.*	Purtători de lentile de contact: amoebe libere, *Acanthamoeba, Naegleria*
Endoftalmite (inflamaţii ale ţesuturilor intraoculare)	Aceleaşi microorganisme ca şi în cazul keratitelor, la care se adaugă: *N. meningitidis, Bacillus cereus*, enterococi, SCN şi levuri	

BCU "IULIA HAŞDEU" UNIVERSITY LIBRARY

15.15. Examenul bacteriologic al prelevatelor perinatale

Contaminarea perinatală se poate produce *in utero*, la naştere sau imediat după naştere.

În cursul dezvoltării intrauterine, fătul este contaminat pe cale transplacentară, dacă mama prezintă bacteriemie cu specii care pot traversa placenta (de exemplu, *L. monocytogenes*, *T. pallidum*), consecinţele fiind totdeauna severe (avort, naştere prematură, malformaţii, sindrom infecţios congenital).

Infecţiile neonatale sunt contactate în timpul naşterii, la trecerea prin căile genitale ale mamei. Colonizarea masivă cu specii patogene sau comensale din microbiota genitală a mamei (*Chlamydia, N. gonorrhoeae, T. pallidum, Str. agalactiae* grup B, *E. coli* K1, *H. influenzae* biotip 4, *H. haemolyticus, S. aureus, Streptococcus spp, Enterococcus spp,* enterobacterii, *Gardnerella vaginalis*, specii strict anaerobe, *Mycoplasma, Ureaplasma*) poate conduce la apariţia unor procese infecţioase severe, manifestate mai ales la nivelul tractului respirator. La etiologia bacteriană, se adaugă cea virală (virusuri herpetice, virusuri hepatitice).

Infecţiile post-natale sunt dominate de semne meningeale, fiind rezultatul contaminării în primele 8 ore după naştere cu microorganisme din mediu sau din microbiota mamei.

Prognosticul infecţiilor nou-născutului este dependent de rapiditatea administrării tratamentului.

Decizia terapeutică se ia la naştere, sau uneori chiar înainte, pe baza unor argumente anamnestice, clinice, biologice şi bacteriologice (tabelul 60).

Tabelul 60.

Produse patologice analizate pentru diagnosticul sau prevenirea infecţiilor nou-născutului.

Aspirat gastric	Probe din orificii şi cutanate	Meconiu	Placentă	Lichid amniotic	Endocol	LCR Hemocultură Urină Secreţii vaginale
Câţiva ml de lichid gastric – prin aspiraţie cu ajutorul unei sonde gastrice nr. 8 montată pe o seringă de 10 ml.	1–3 tampoane din situsuri cutanate şi orificii (pliuri bucale, nas şi conduct auditiv), transportate la temperatura camerei, pe mediu de transport tip Stuart.	Recoltat în primele 24 de ore de la naştere, cu ajutorul unei spatule sterile (câţiva ml).	Prelevare cu ajutorul unui scalpel steril dintr-o zonă cu aspect macroscopic anormal.	In caz de rupere precoce a apei. Considerat un prelevat din situs steril. Recoltare după curăţarea corectă a exocolului (0,5 ml).	Prelevat de endocol realizat corect (fără contaminare vaginală) la ultimul consult înainte de data naşterii. Recoltare după curăţarea exocolului cu tampon şi AFS	Vezi capitolele dedicate produselor patologice respective
Str. agalactiae, E. coli (K1), H. influenzae, L. monocytogenes	*Str. agalactiae, E. coli (K1), H.influenzae, L. monocytogenes*	*Str. agalactiae, E. coli (K1), H.influenzae L. monocytogenes*	*Str. agalactiae, E. coli (K1), H. influenzae, L. monocytogenes*	Enterobacterii, streptococi, *Listeria, Haemophilus, Gardnerella,* alte bacterii aerobe şi anaerobe comensale ale căilor genitale.	Diagnosticul infecţiilor corioamniotice ascendente: *Str. agalactiae, E. coli (K1), H. influenzae, L. monocytogenes*	*Str. agalactiae, E. coli (K1), H. influenzae, L. monocytogenes.*

Transportate la temperatura ambiantă în maxim o oră de la naştere.
Însoţite de detalii clinice, ora naşterii şi a prelevării probei.

Examinarea directă
- frotiuri colorate Gram informative în cazul produselor sterile (aspirat gastric, meconiu);
  - o prezenţa unei microbiote monomorfe pledează pentru o infecţie;
  - o prezenţa unei microbiote abundente şi polimorfe pledează pentru contaminare în timpul recoltării sau transportului.

Cultivare
- mediu îmbogăţit (geloză cu sânge tratat termic);
- mediu selectiv pentru streptococi şi *Listeria* (geloza sânge şi acid nalidixic-colistin sau ANC);
- mediu selectiv pentru bacili Gram negativi;
- mediu solid pentru strict anaerobi din lichidul gastric.

Mediile sunt incubate 48 ore la 37°C, iar în cazul mediului cu sânge, în atmosferă de 5-10% CO_2

Antibiograma
Se recomandă pentru bacteriile patogene:
- *E. coli* K_1: fenotipuri de rezistenţă dobândită;
- *Str. agalactiae*: rezistenţa la macrolide şi cicline;
- *H. influenzae*: prezenţa de β-lactamaze;
- *Listeria*: rezistenţa naturală la cefalosporine, rezistenţa dobândită la macrolide, fluoroquinolone, cotrimoxazol

Observaţii:
Trebuie identificate speciile cu risc, considerate patogene
Prezenţa unei specii dominante în 2 prelevate din situsuri diferite este considerată semn de infecţie
Tulpinile de *Listeria* sunt trimise la centrul de referinţă
Determinarea grupului capsular K_1 de *E. coli* se face prin aglutinare pe lamă

15.16. Izolarea şi identificarea bacteriilor anaerobe

În patologia infecţioasă cu bacterii anaerobe etiologia este reprezentată de specii anaerobe rezidente ale ţesutului cutanat (*Eubacterium, Propionibacterium, Peptostreptococcus*), ale cavităţii bucale (*Porphyromonas, Bacteroides, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Veillonella, Actynomyces, Bifidobacterium*), tractului respirator, mucoasei vaginale (*Lactobacillus* +++, *Prevotella sp., Prevotella pigmentes, Prevotella disiens, Peptostreptococcus ssp.*), colonului (*Bacterioides grup fragilis* +++, *Bilophila wadworthia, Peptostreptococcus ssp., Clostridium spp., Bifidobacterium spp., Eubacterium spp.*) (tabelul 61). Ea include abcese cerebrale, infecţii oculare, sinuzite, infecţii bucale şi dentare, complicaţii ale anginei Vincent, actinomicoze, infecţii pleuropulmonare, endocardite, abces hepatic, septicemie (5-10% din hemoculturi sunt pozitive pentru anaerobi), infecţii intraabdominale, colite pseudomembranoase, peritonite, infecţii de tract genital, mionecroze, supuraţii închise (cu miros fetid), infecţii situate în vecinătatea mucoaselor (bucală, anală, genitală), cu supuraţie cu aspect granular de culoare galbenă, infecţii secundare apărute după muşcături, injecţii intramusculare, traumatisme, intervenţii chirurgicale la nivelul tractului digestiv, căilor genitale, de ortopedie, toxiinfecţii sau intoxicaţii. În mai mult de 80% din cazuri, infecţiile sunt mixte, cu bacterii aerobe sau aero-anaerobe şi strict anaerobe. Cea mai mare parte dintre aceste bacterii se dezvoltă lent.

Tabelul 62.

Frecvenţa de izolare a diferitelor specii de anaerobi în supuraţiile mixte.

	Supuraţii abdominale	Secreţii purulente genitale	Pneumonie ab ingestis	Abcese pulmonare, pleurezii purulente	Infecţii supurative în sfera ORL	Ţesuturi moi
Bacteroides fragilis	+++	(+)	/	+	(+)	+
Bacteroides grup fragilis	++	(+)	(+)	+	(+)	+
Prevotella bivia	/	+++	/	0	0	
Prevotella oralis	/	+	+++	+++	++	+
Porphyromonas spp.	/	+	(+)	(+)	+	++
Fusobacterium niucleatum	/	+	++	+++	++	/
Fusobacterium necrophorum	/	/	/	/	++	/
Peptostreptococcus spp.	+	++	++	++	++	++
Actinomyces spp.	/	++	+	++	++	(+)
Cl. perfringens	++	/	+	/	0	+

+++ tulpini izolate în majoritatea cazurilor din produsele patologice respective;
+ şi ++20–80%;
(+)10–20%.

Prelevarea produselor patologice pentru diagnosticul bacteriilor anaerobe

Recoltarea trebuie precedată de dezinfecţie cu iod, apoi cu alcool 70%, urmată de puncţionarea focarului de infecţie cu seringă sau pipetă Pasteur, sau cu chiureta în profunzime, evitând formarea bulelor de aer; recoltarea este de preferat să se facă în laborator, în caz contrar, proba se introduce într-un flacon cu mediu de transport pentru anaerobioză (mediu ce conţine un gaz fără O_2, mediu gelozat – Portagerm, TGVanaerob, Port A Cul sau soluţie tampon care permite supravieţuirea bacteriilor în anaerobioză mai mult de 48 de ore şi un indicator de anaerobioză, de exemplu, rezasurina) sau într-o seringă închisă la ambele extremităţi. Recoltarea cu tamponul este interzisă.

În laborator, anaerobioza poate fi asigurată cu mai multe dispozitive: gaz-vacuum (2 ore), saci de anaerobioză, din plastic, închişi ermetic, jar cu anaerobioză (15 minute), cameră cu anaerobioză (cu atmosferă 5:15:80/H_2:CO_2:N_2 sau cu catalizator de Pd). Este necesară verificarea anaerobiozei cu un indicator oxido-reducător (bandă de hârtie de filtru impregnată cu albastru de metilen sau rezasurină).

Etapele diagnosticului microbiologic

La *examenul macroscopic* se poate constata supuraţie (abces submaxilar sau cervical, pleurezii purulente, peritonite, abcese genitale), cu aspect de granule de S, cu miros neplăcut datorită produşilor finali de metabolism, fluorescenţă roşie, ţesuturile sunt necrotice datorită pigmenţilor produşi de bacilii Gram negativi pigmentaţi.

La *examenul microscopic* coloraţia Gram variabilă este sugestivă pentru o infecţie cu bacterii anaerobe. Examenul microscopic al frotiului realizat direct din produsul patologic evidenţiază microorganisme sporulate sau un polimorfism accentuat, iar culturile incubate în aerobioză rămân sterile.

În funcție de morfologie și afinitatea tinctorială, diagnosticul poate fi orientat către diferite genuri și/sau specii:

- cocobacili Gram negativi: *Prevotella, Prophyromonas, Haemophylus*;
- bacili Gram negativi fini efilați: *Fusobacterium, Capnocytophaga;*
- bacili foarte lungi, Gram negativi, cu un capăt filiform, iar celălalt pătrat: *Leptotrichia*;
- coci de dimensiuni mici, Gram negativi: *Veillonella*;
- bacili Gram pozitivi, sporulați: *Clostridium*;
- bacili Gram pozitivi, nesporulați: *Actinomyces, Propionibacterium, Bifidobacterium, Eubacterium.*

Izolarea necesită medii gelozate, cu numeroși factori de creștere și selectivitate ridicată, datorată adaosului de antibiotice. Însămânțarea produsului patologic se realizează pe:

- *mediu Schaedler* cu sânge, vancomicină (7,5 mg/l) și neomicină (75mg/l). Acest mediu permite izolarea *Bacteroides* grup *fragilis*, *Prevotella, Fusobacterium;*
- geloză Columbia cu sânge și feniletilalcool (4,2g/100ml), specific pentru bacteriile Gram pozitive și *Porphyromonas;*
- pentru *Clostridium:* TSN, geloză cu gălbenuș de ou și neomicină, respectiv Columbia cu sânge, cicloserină și cefoxitin pentru *C. difficile;*
- totdeauna trebuie asociat un mediu lichid pentru anaerobi, repicat după 48-72 de ore pe geloză selectivă.

Toate mediile pentru anaerobi trebuie regenerate (pentru eliminarea O_2) înainte de utilizare pe baie Marie, la 100° C, timp de 20 minute.

Gelozia repartizată în coloană înaltă se incubează în aerobioză.

Jarurile de anaerobioză se deschid la cel puțin 24 de ore de incubare, iar în unele cazuri la 48 de ore.

De obicei, pe mediile de anaerobi apar colonii cu caractere diferite, care uneori reprezintă forme disociate ale aceleiași specii. Coloniile au miros fetid, adesea sunt pigmentate și sunt diferite și în general mult mai mari decât cele crescute pe mediile incubate în aerobioză.

Se face examenul microscopic pentru fiecare morfotip în parte.

Morfotipurile se însămânțează pe medii lichide îmbogățite cu vitamina K1 și hemină de pe care se realizează testul indolului, catalazei, ureazei și aerotoleranței (creștere în atmosferă de CO_2 5%).

Dacă la examenul microscopic se observă bacili, se realizează o serie de teste enzimatice: pentru producerea de hemolizine, fosfolipaze (lecitinază), lipaze, proteaze, fermentarea glucidelor, hidroliza esculinei, seroneutralizare și toxinotipie și stabilirea tipului fermentativ, după incubare timp de 48 de ore în mediu TGY, urmată de extracția alcoolilor și acizilor volatili cu eter etilic și analiza cromatografică și respectiv, prin esterificarea și extracția compușilor nevolatili.

Din fiecare morfotip se realizează o pre-identificare printr-o mini-antibiogramă: vancomicină, colistin, metronidazol, verde briliant, săruri biliare, SPS (sodiu polietanol sulfat) (tabelul 62).

Tabelul 62.

Miniantibiograma folosită în diferențierea genurilor de bacterii anaerobe.

	Vancomicină 5 µg	Kanamicină 10 µg	Colistin 10 µg	Rezistență la bilă bovină 2 %	SPS	Metronidazol 4 µg
Grup B. fragilis	R	R	R	+		S
Prevotella sp.	R	R	V	-		S
Porphyromonas sp.	S	R	R	-		S
B. meolitycum sp.	R	S	S	-		S
Fusobacterium sp.	R	S	S	V		S
Weillonella sp.	R	S	S	-		S
Pepstostreptococcus anaerobius	S	R	R	V	S	S
Pepstostreptococcus sp.	S	S	R	V	R	S
Clostridium sp.	S	S	R	V		S
Eubacterium sp.	S	S	R	+		S
Actinobacterium sp.	S	S	R	-		R
Bifidobacterium sp.	S	S	R	+		R
Propionibacterium sp.	S	S	R	V		R

Diferențierea anaerobilor facultativi aparținând clasei *Actinobacteria* (*Actinomyces, Actinobacterium, Arcanobacterium, Bifidobacterium, Propionibacterium, Eubacterium*) se realizează cu ajutorul testelor API pentru anaerobi.

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sensibilitatea la antibiotice

Bacterioides grup fragilis sunt rezistente la numeroase antibiotice. Unele specii sunt secretoare de β-lactamaze, altele sunt rezistente la metronidazol. Antibioticele recomandate a fi testate pentru diferite specii sunt prezentate în tabelul 63.

Tabelul 63.

Antibiotice testate pentru bacterii anaerobi

Bacterioides grup fragilis	Amoxicilină, amoxicilină+acid clavulanic, cefoxitin, cefotaxim, imipenem, clindamicină, metronidazol.
Alţi bacili Gram negativi (*Prevotella, Fusobacterium*)	Amoxicilină, amoxicilină+acid clavulanic, metronidazol.
Coci Gram pozitivi şi bacili Gram pozitivi nesporulaţi (*Propionibacterium, Actinomyces*)	Penicilină, metronidazol, vancomicină, ofloxacin (pentru *Propionibacterium*)
Clostridium sp.	Ampicilina, amoxicilina+acid clavulanic, metronidazol, vancomicină, clindamicină.

15.17. Diagnosticul infecţiilor cu micobacterii

În ultimele decenii, pandemia globală HIV, îmbătrânirea populaţiei, degradarea condiţiilor socio-economice, au determinat creşterea incidenţei tuberculozei. Imunodepresia datorată SIDA a favorizat apariţia infecţiilor cu *M. avium*, dar şi cu multe alte micobacterii non-tuberculoase, cunoscute sau descoperite cu ocazia infecţiilor sistemice apărute la pacienţii imunodeprimaţi. Deşi tratamentul împotriva tuberculozei şi-a dovedit eficacitatea, apariţia tulpinilor multirezistente şi dezvoltarea infecţiilor sistemice provocate de micobacteriile non-tuberculoase, necesită descoperirea unor antibiotice. Risc crescut de îmbolnăvire prezintă persoanele vârstnice, pacienţii imunodeprimaţi, persoanele malnutrite, imigranţii din ţări cu endemie tuberculoasă, deţinuţii, personalul medical în contact cu pacienţii TBC.

Speciile de micobacterii cel mai frecvent întâlnite în diferite tipuri de infecţii sunt:

- infecţii pulmonare: *M. avium – intracellulare, M. kansasii, M. xenopi, M. malmoense;*
- infecţii ganglionare: *M. avium – intracellulare, M. kansasii, M. scrofulaceum;*
- infecţii cutanate*: M. marinum, M. ulcerans, M. chelonaey, M. leprae;*
- supuraţii şi ulceraţie*: M. avium-intracellulare, M. kansasii, M. xenopi, M. abcessus, M. chelonaey;*
- infecţii sistemice: *M. avium – intracellulare, M. kansasii, M. xenopi, M. haemophilum, M. gevanense.*

Recoltarea produselor patologice

Sputa

Reprezintă 80–85% din numărul probelor analizate pentru infecţie cu micobacterii. Sputa se recoltează dimineaţa (2–5 ml), după clătirea cavităţii bucale şi un efort de tuse pentru eliminarea secreţiilor acumulate în timpul nopţii. Produsul recoltat este trimis rapid la laborator şi conservat la +4°C. Păstrarea la frigider 24 sau 48 ore nu influenţează calitatea rezultatului final. Pacienţii care nu pot să expectoreze vor fi ajutaţi de un maseur kinetoterapeut sau se va recurge la tubaj gastric, care permite prelevarea directă din stomac a secreţiilor bronşice înghiţite involuntar în timpul somnului.

Lichidul gastric aspirat dimineaţa, pe nemâncate, este centrifugat la 3000 rpm, timp de 20 minute. Sedimentul obţinut (2 ml) va fi tratat pentru decontaminare.

La **pacienţii intubaţi** (din reanimare) se recoltează secreţiile traheale prin introducerea unei sonde de aspiraţie, produsele fiind manipulate şi tratate ca şi sputa.

Fibroscopia permite recoltarea produselor direct din zona cu leziuni sub forma de:

- **aspirat bronşic** diluat în apă distilată sterilă, tratat ulterior ca şi sputa;
- **raclaj endobronşic** obţinut cu ajutorul unei mici perii care va fi plasată în lichidul de transport (1 ml), tratat ca şi sputa;
- **lichid de lavaj bronho-alveolar** (obţinut prin inundarea segmentului pulmonar cu 200 ml AFS şi reaspirarea lichidului); după centrifugare, sedimentul (2 ml) este tratat ca o spută.

Urina se recoltează pe parcursul unei zile, după restricţie hidrică în seara precedentă, este centrifugată la 1600–2000 g (30000 rpm), iar sedimentul va fi decontaminat.

LCR

Sedimentul rezultat după o centrifugare de 20 minute, 1600 g, este etalat pe lamă pentru colorare.

Lichidele pleurale, de ascită şi articulare, puroiul de abces sunt utilizate direct (dacă lichidul este tulbure, purulent) sau după centrifugare (lichid clar, limpede) pentru colorare şi însămânţare pe medii adecvate. Însămânţarea constă în inocularea tuburilor cu mediu cu ou, fără alte tratamente, la o diluţie a produsului 5/6 părţi ADS.

La pacienţii imunodeprimaţi cu infecţii generalizate, micobacteriile pot fi evidenţiate în *hemoculturi, mieloculturi, materii fecale.*

Biopsia de endometru permite izolarea micobacteriilor care produc tuberculoza genitală la femei.

Fragmentele de organe recoltate steril de către chirurg sunt mojarate, omogenizate şi folosite pentru însămânţarea mediilor speciale.

Probele se recoltează înainte de începerea tratamentului sau după minimum 3 zile de la încetarea acestuia.

Deoarece emisiile bacilare sunt discontinue, trebuie realizate 3 recoltări în 3 zile succesive.

Pentru izolarea micobacteriilor nu se folosesc produsele fixate cu formol.

Examenul microscopic

Se realizează pe frotiuri din produsul patologic sau din sedimentul de centrifugare obţinut după fluidificarea-decontaminarea produsului patologic contaminat. Se utilizează coloraţia Ziehl-Neelsen şi coloraţia cu auramină. În tehnica Ziehl-Neelsen, bacilii acido-alcoolo rezistenţi (BAAR) apar roşii pe fond albastru. Citirea se face la obiectivul cu imersie (x 100).

Frotiul colorat cu auramină este examinat la microscopul de fluorescenţă (x 25. B.A.A.R apar fluorescenţi, strălucind pe fondul negru al preparatului).

Citirea frotiului este cantitativă:

Număr de BAAR	Răspuns
<1 bacil/100 câmpuri	Negativ
1–9 bacili/100 câmpuri	+ suspect – se repetă
10–99 bacili/ 100 câmpuri	++
1–9 bacili/ câmp	+++
10–99 bacili/ câmp	++++
> 100 bacili/ câmp	+++++

Însămânţarea produselor patologice

Obţinerea unei culturi este foarte importantă pentru diagnosticul bacteriologic, pentru că teoretic, toţi bacilii vii dau naştere unei descendenţe.

Prelevatele care sunt în mod normal sterile (LCR, lichid pleural, pericardic, auricular, măduva osoasă, sânge) sunt inoculate direct pe mediu de cultură fără un alt tratament prealabil, în timp ce produsele contaminate sunt supuse decontaminării (tratamentul cu baze, acizi, detergenţi, permite eliminarea microbiotei comensale cu conservarea micobacteriilor, iar fluidificarea probei prin lichefiere permite eliberarea micobacteriilor).

Mediile de cultură

Mediul Lövenstein-Jensen, cu ou, este mediul de referinţă recomandat de UICTMR (Uniunea Internaţională Contra Tuberculozei şi a Maladiilor Respiratorii). Dacă este îmbogăţit cu piruvat, permite o creştere mai bună a micobacteriilor disgonice (*M. bovis*).

Mediul gelozat Middlebrook 7H10-7H11 este utilizat pentru antibiogramă.

Mediile lichide Middlebrook 7H9-7H12-7H13, Dubos şi Kirchner, sunt medii de îmbogăţire, ce conţin antibiotice (polimixină, amfotericină, acid nalidixic, trimetoprim, azlocilin, vancomicină).

Mediile 7H12 şi 7H13 utilizate în metoda Bactec 460 conţin acid palmitic marcat cu carbon 14. Metabolizarea acidului palmitic de către micobacterii este corelată cu apariţia $^{14}CO_2$ dozat printr-o cifră care reprezintă Indicele de Creştere (IC).

O serie de metode moleculare (*hibridizarea in situ, PCR*) sunt utilizate în prezent pentru diagnosticul infecțiilor cu micobacterii, în special *M. tuberculosis*.

Identificarea micobacteriilor

Prima etapă a identificării constă în verificarea caracterului de acido-alcoolo-rezistență a bacteriilor prin coloraţia Ziehl-Neelsen.

Se notează de asemenea, timpul de apariție al coloniilor sau detecția unui IC suficient.

Pentru culturile obținute pe mediul solid, se verifică existența unui singur tip de colonii. *M. avium* poate forma 2 tipuri de colonii.

Se examinează caracterele de colonie (dimensiune, caracterul neted sau rugos, pigmentație la întuneric, după expunerea la lumină sau absența pigmentului), care permit orientarea diagnosticului spre complexul *tuberculosis*, sau spre o specie non *tuberculosis*.

Astfel, pe culturile dezvoltate pe mediu solid, coloniile complexului *tuberculosis* sunt nepigmentate. Pentru diferențierea speciilor complexului *tuberculosis* (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum*, BCG), se recurge la metode clasice biochimice: se pune în evidență producerea de acid nicotinic (testul niacinei), existența unei nitrat-reductaze, influența piruvatului asupra culturii, creşterea sau inhibiția creşterii în prezența TCH, pirazinamidă, cicloserină (tabelul 64).

În mediul lichid, dacă IC atinge sau depăşeşte 300 se realizează hibridizare cu sonde specifice.

Tabelul 64.

Caractere diferențiale între diferite specii de micobacterii tuberculoase.

Specia	Creştere în prezența piruvatului	TCH 2mg/l	PZA 200mg/l	CS 30mg/l	Nitrat*-reductaza	Testul niacinei
M. tuberculosis	–	R	S	S	+	+
M.africanum	+	S(v)	S	S	– (v)	(v)
M. bovis	+	S	R	S	–	–
M. bovis var. BCG	–	S	R	R	–	–

* Metoda Virtanen, TCH – hidrazida acidului tiofen 2 – carboxilic; PZA – pirazinamida; CS – cicloserina; v – variabil; R – rezistent; S – sensibil.

Micobacteriile non *tuberculosis*

- *M. avium-intracellulare* formează colonii nepigmentate, de 2 tipuri: i) netede, transparente şi ii) opace, rugoase, formate din cocobacili acido-alcoolo-rezistenți.
- *M. kansasii* formează colonii fotocromogene, cu creştere eugonică, rugoase, constituite din bacili groşi.
- *M. gordonae* formează colonii scotocromogene (pigmentate la întuneric), groase, netede, constituite din bacili de dimensiuni medii.
- *M. xenopi* formează colonii mici, cu creştere lentă, favorizată de piruvat, constituite din bacili lungi, filiformi.

Dacă aspectul coloniilor nu este edificator, se face identificarea biochimică (fig. 351). Testele biochimice sunt realizate şi interpretate cu dificultate, necesitând tulpini de referință care trebuie întreținute.

Cromatografia acizilor micolici extraşi din peretele micobacteriilor se face prin HPLC, permițând obținerea profilului caracteristic speciei.

Tipizarea tulpinilor se realizează prin tehnica RFLP, în care, după digestia enzimatică a moleculei de ADN cromosomal sunt obținute fragmente al căror număr şi dimensiune variază în funcție de tulpina analizată şi de enzima utilizată. Fragmentele obținute sunt separate prin electroforeză. Metoda care constă în identificarea numărului de secvențe IS 6110, ce variază în funcție de tulpină, permite, după migrarea electroforetică şi transferul pe o membrană de nylon, realizarea unei hibridizări cu o sondă specifică.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

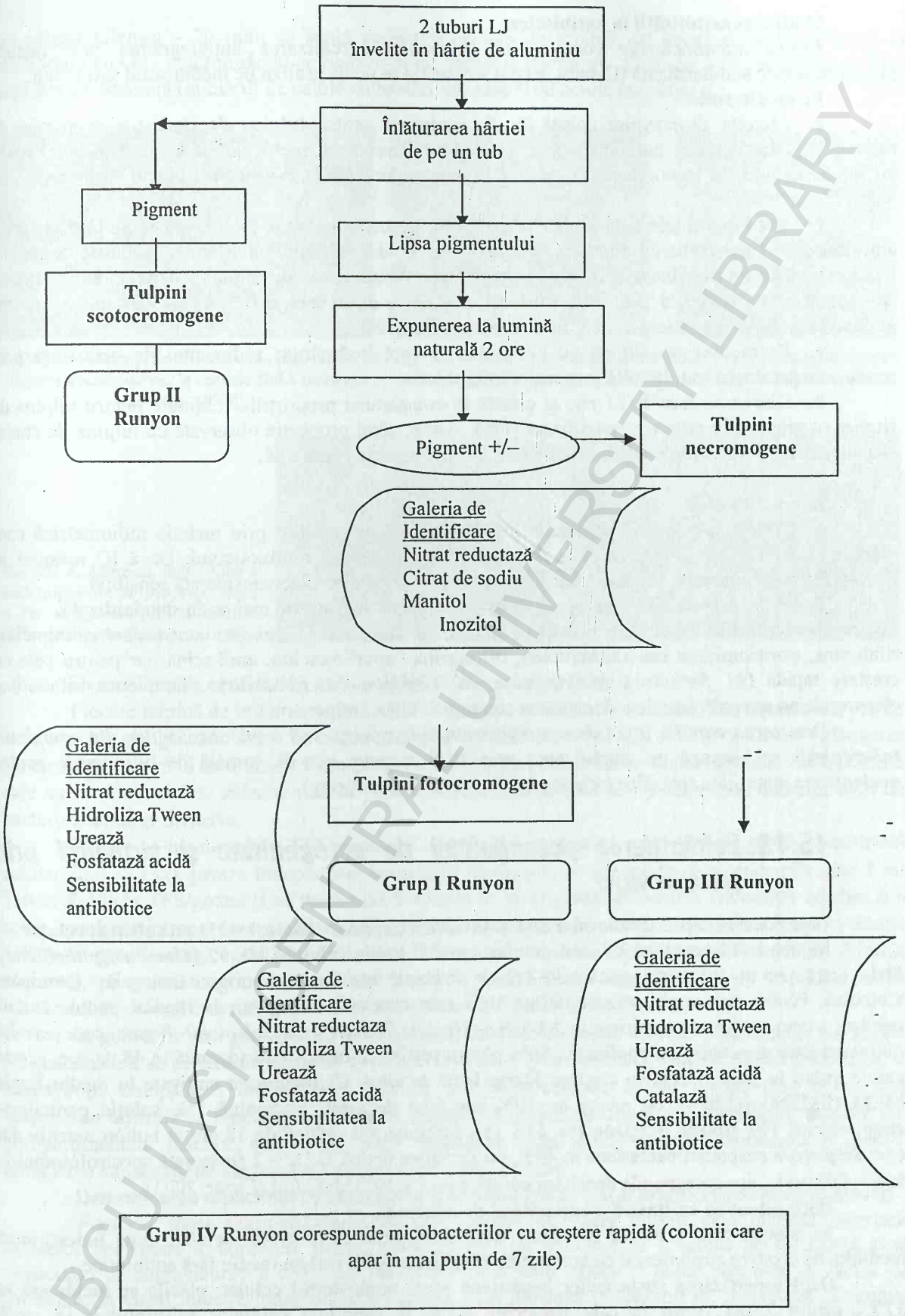


Fig. 351. Schema de tipizare a micobacteriilor non-tuberculoase.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Studiul sensibilității la antibiotice

Pentru micobacteriile complexului tuberculosis, realizarea antibiogramei prin metoda proporțiilor este standardizată (Canetti, Rist, Grosset) și se poate realiza pe mediu solid sau lichid.

Pe mediu solid

a. Metoda proporțiilor constă în determinarea pentru tulpina de studiat a proporției de mutante rezistente la un antibiotic, obținute după cultivarea pe medii solide ce conțin concentrații critice de antibiotice și comparate cu numărul bacteriilor viabile din același inocul însămânțate pe medii fără antibiotice.

b. Antibiogramele sunt realizate în mediu cu ou impregnat înainte de coagulare cu patru antibiotice de bază (tuberculostaticele majore): izoniazida, rifampicina, etambutolul, streptomicina. Dacă este vorba de micobacterii izolate în timpul unei recidive, sau de tulpini rezistente, antibiograma se completează cu studiul activității antibioticelor din a doua categorie (de rezervă): pirazinamida, amikacina, cicloserina, etionamida, ofloxacina, sparfloxacina.

c. Pe mediul de cultură cu antibiotice se pot însămânța: sedimentul de centrifugare al produsului patologic sau diluțiile suspensiei microbiene.

d. Citirea se face la 21 zile și constă în compararea proporțiilor obținute pentru tulpina de studiat cu proporțiile critice standardizate (1%). Astfel, când proporția observată cu tulpina de studiu este mai mică de 1%, tulpina este sensibilă, în caz invers, este rezistentă.

În mediu lichid

a. Se utilizează aceeași metodă a proporțiilor, dar stabilite prin metoda radiometrică care măsoară cantitatea de $^{14}CO_2$ produsă în prezența și în absența antibioticului. Dacă IC măsurat în flaconul cu antibiotic este 1% din cel al flaconului martor, tulpina este considerată sensibilă.

Pentru micobacteriile non tuberculoase, metoda de studiu este mai puțin standardizată. Pentru micobacteriile cu creștere lentă (*M. avium, M. kansasii, M. xenopi)* sunt testate rifampicina, rifabutina, claritromicina sau azitromicina, ofloxacina / sparfloxacina, amikacina, iar pentru cele cu creștere rapidă (*M. fortuitum, M. marinum, M. chelonae, M. abcessus*): rifampicina, rifabutina, claritromicina sau azitromicina, doxiciclina sau minociclina, imipenem.

Detectarea rapidă, în 24 de ore a rezistenței la rifampicină a micobacteriilor din complexul ***tuberculosis*** se bazează pe amplificarea prin PCR a genei *rpo B*, urmată de hibridizare pentru evidențierea mutațiilor specifice (tehnica LIPA – Line Probe Assay).

15.18. Evidențierea potențialului de patogenitate și virulență prin teste in vitro

Determinarea capacității **de aderență și invazie a tulpinilor bacteriene la un substrat celular**

Modelul utilizează ca substrat celular sensibil liniile celulare HEp-2 (*Human Epithelioma*), HeLa (carcinom de col uterin) sau CaCo-2 (linie de celule intestinale, de origine tumorală – **C**arcinom **Co**lonic). Pentru cultivarea acestei ultime linii este necesară adăugarea la mediul pentru culturi celulare a unui supliment nutritiv numit **I.T.S.** – *(Insulin Transferrine Selenium)- Sigma,* care permite obținerea unui monostrat cu confluență 80% pentru realizarea testului de aderență în 48 de ore, aceste celule având în mod normal o creștere foarte lentă *in vitro*. Celulele sunt cultivate în mediu Eagle MEM (EMEM) (Gibco), cu adaos de 10% ser fetal de vițel, glutamină 1%, soluție penicilină-streptomicină 1%, soluție fungizon 1%, ITS 1%. Se utilizează culturi de 18 ore în bulion nutritiv din care se prepară suspensii bacteriene în TFS, cu densitate optică D.O. = 2 (măsurată spectrofotometric la $\lambda = 600$ nm), care corespunde densității celulare de 1×10^9 U.F.C./ml (Lazăr, 2003).

Determinarea calitativă a capacității de aderență

Se adaugă câte 1 ml de suspensie bacteriană peste monostratul celular, după îndepărtarea mediului de creștere suplimentat cu antibiotice și spălarea (de 3 ori) cu mediu fără antibiotice.

După repartizarea suspensiilor bacteriene peste monostratul celular, plăcile se incubează la 37°C, pentru 2 ore, timp în care bacteriile aderă la suprafața celulelor substratului; se spală monostratul celular infectat, cu TFS (3x); se fixează cu metanol (5 min.); se colorează celulele aderate

cu soluție Giemsa – 20 min; se spală godeurile cu apă de robinet; se usucă și se examinează la microscop cu O.I., determinându-se *pattern*-ul de aderență (localizat, difuz sau agregativ) (fig. 352) și indicele de aderență (numărul de celule cu bacterii aderate /100 celule numărate).

Fig. 352 a. Aderența de tip localizat a unei tulpini de *Staphylococcus aureus* la celulele HeLa (colorație Giemsa, x1000).

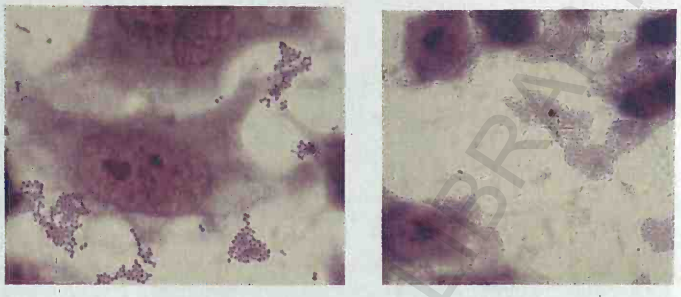


Fig. 352 b. Aderența de tip agregativ a unei tulpini de *Staphylococcus aureus* (stg.) și *Ps. aeruginosa* (dr.) la celulele HeLa (colorație Giemsa, x1000).

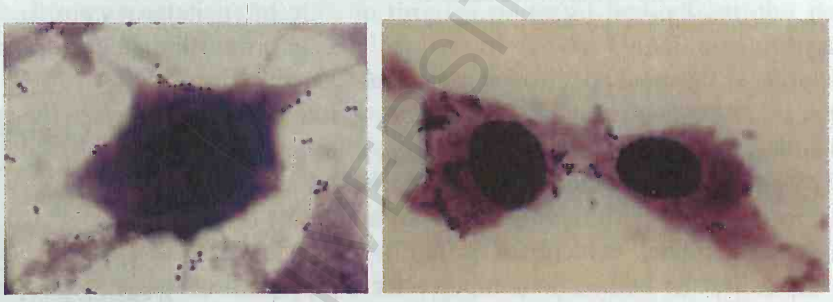


Fig. 352 c. Aderența de tip difuz a unei tulpini de *Str.pyogenes* (stg.) și *Ps. aeruginosa* (dr.) la celulele HeLa (colorație Giemsa, x1000).

Determinarea cantitativă a capacității de aderență și invazie

Fiecare tulpină de testat se va inocula în 2 godeuri cu monostrat celular. După primele 2 ore de incubare se adaugă câte 1 ml de mediu cu gentamicină într-unul din cele 2 godeuri. Adăugarea gentamicinei are rolul de a omorî toate bacteriile din mediul extracelular, supraviețuind doar bacteriile care au invadat celulele substratului. În godeurile fără gentamicină se va determina numărul total de bacterii aderate și invazive.

Plăcile se incubează la 37°C, timp de o oră; se îndepărtează mediul și se spală monostratul celular cu TFS (3x), pentru îndepărtarea bacteriilor neaderate; se adaugă în toate godeurile câte 1 ml Triton X-1% în TFS/godeu și se incubează 5 minute la 37°C pentru eliberarea bacteriilor aderate și a celor invadante intracelulare; se fac diluții zecimale din suspensiile din fiecare godeu (până la diluția $1/10^8$) în apă fiziologică sterilă (AFS), care se însămânțează în triplicat (câte 10 µl din diluțiile obținute), pe geloză nutritivă repartizată în plăci, pentru determinarea U.F.C./ml (se face media numărului de colonii crescute pentru cele trei replici ale fiecărei diluții însămânțate).

În godeurile fără gentamicină se determină numărul de celule aderate și invadante, iar în cele cu gentamicină se determină numărul de celule invadante (internalizate). Interpretarea rezultatelor se bazează pe compararea ordinelor de mărime ale numărului de celule viabile (U.F.C./ml) din suspensiile utilizate ca inocul pentru fiecare tulpină bacteriană testată și din suspensiile celulare din compartimentele plăcilor *multi-well,* după realizarea celor două modele experimentale pentru aprecierea capacității de aderență + invazie și respectiv, invazie.

Determinarea capacității de aderență la substratul inert – testul producerii de *slime* (peliculă)

Factorul slime (exopolizaharid hidrofil secretat de unele tulpini care mediază aderența celulelor bacteriene la suprafețe inerte, abiotice) este un indicator al gradului de rezistență și al capacității de supraviețuire a tulpinilor bacteriene în mediul extern și poate constitui un factor de virulență, în cazul infecției unui organism gazdă, prin blocarea procesului de fagocitoză. Tulpinile bacteriene sunt cultivate pe geloză cu sânge de berbec, incubată timp de 24 h la 37°C. Pentru fiecare tulpină se obțin din câte o colonie, două suspensii bacteriene identice în apă peptonată (repartizată câte

1 ml în tuburi de diametru de 12 mm), incubate timp de 24 h la 37°C. După incubare, tuburile sunt golite de cultura bacteriană, spălate de 3 ori cu apă de robinet, uscate la temperatura camerei, colorate cu soluție alcoolică de safranină 1% – 30 min, spălate de 2 ori cu apă de robinet și uscate. Prezența inelului roșu pe pereții interiori ai tuburilor se înregistrează ca rezultat pozitiv, iar absența inelului roșu ca rezultat negativ (fig. 353).

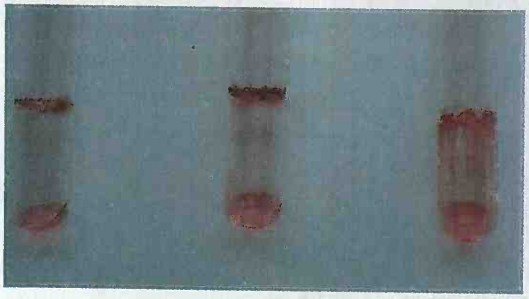


Fig. 353. Evidențierea semicantitativă a producerii de *slime*.

Evidențierea cantitativă a gradului de aderență la substratul inert se poate realiza prin metoda microtitrării. În acest scop, suspensiile microbiene de densitate cunoscută se însămânțează în mediu lichid repartizat în plăci cu 6/12/24/96 de godeuri, se incubează la 24 h la 37°C. După incubare plăcile sunt golite de cultura bacteriană, spălate de 3 ori cu apă de robinet, fixate cu metanol rece timp de 5 min, colorate cu cristal violet 1% – 15 min, spălate cu apă de robinet, resuspendate cu acid acetic 33%. Intensitatea culorii suspensiei colorate, direct proporțională cu capacitatea de aderență la substratul inert, se măsoară spectrofotometric (A490 nm) (fig. 354).

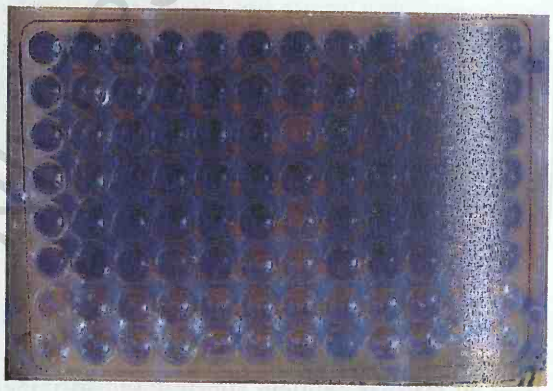


Fig. 354. Evidențierea cantitativă a producerii de *slime* pirn metoda microtitrării.

Evidențierea hemolizinelor. Hemolizinele sunt enzime extracelulare care acționează în patogeneza diferitelor specii bacteriene ca toxine formatoare de pori. Bacteriile produc mai multe tipuri de hemolizine, evidențiate prin diferite teste: liza hematiilor de berbec (evidențierea factorul hemolitic Kanagawa) sau teste de sinergism pentru evidențierea hemolizinelor incomplete, solubile, termostabile, de tip factori CAMP-*like* (Christie, Atkins, Munch-Petersen, 1944, Munch-Petersen și Christie, 1947), care produc liza hematiilor doar în prezența unei sfingomielinaze C (toxina ß) produsă de o tulpină de *S. aureus*. Dintre hemolizine, cea de tip Kanagawa are rol de enterotoxină, a cărei acțiune toxică a fost demonstrată în teste de patogeneză experimentală (determină acumularea lichidului în ansa ligaturată de iepure, ceea ce demonstrează inducerea formării porilor în enterocite și alterarea *pattern*-ului secretor al acestor celule).

Detectarea producerii de hemolizine se evidențiază prin însămânțarea bacteriei pe geloză repartizată în plăci Petri cu adaus de 5% sânge de berbec sau sânge de iepure (evidențierea hemolizinelor Kanagawa). După incubare la 37°C timp de 24 h se vizualizează apariția zonelor de hemoliză în jurul coloniilor, sub forma unui halou transparent, clar, caracteristic pentru tulpinile β-hemolitice, o hemoliză completă, în care hemoglobina eliberată din hematii sub acțiunea β-hemolizinelor este degradată total până la produși finali de metabolism) sau un halou verzui/roz, caracteristic tulpinilor α-hemolitice care produc o hemoliză parțială, cu degradarea parțială a hemoglobinei, la methemoglobină). Zona de hemoliză poate fi accentuată prin păstrarea plăcilor la frigider câteva ore înainte de citirea rezultatelor (fig. 355).

Fig. 355 a. Colonii ß-hemolitice de *Str. pyogenes* (stg.) și *S. aureus* (dr.).

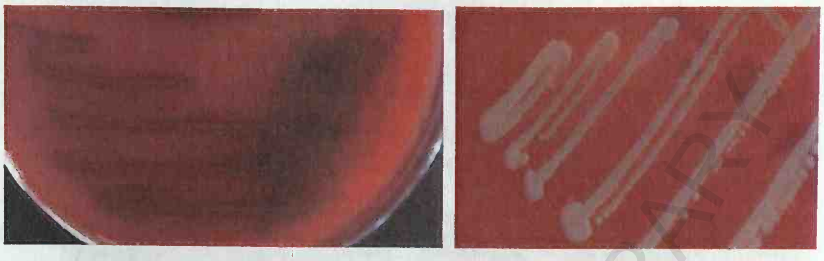


Fig. 355 b. Cultură d-hemolitică de *Str. pneumoniae* (stg.) şi nehemolitică de *S. epidermidis* (dr.).

Testul de evidenţiere a factorului CAMP şi a factorilor CAMP-like

Unele bacterii posedă hemolizine incomplete, care pot induce formarea porilor în membrana eritrocitelor doar în prezenţa unei enzime solubile denumite *sfingomielinaza C*, secretată de tulpini de *S. aureus* β-hemolitice. Pentru detectarea acestor factori CAMP sau CAMP-*like,* tulpinile se însămânţează în striuri paralele pe geloză-sânge, iar perpendicular pe aceste striuri, la 2 mm distanţă, se însămânţează o tulpină de *S. aureus* β-hemolitică ATCC 25923. Prezenţa factorului CAMP este indicată de apariţia unei zone sinergice de hemoliză completă la extremitatea striurilor din vecinătatea tulpinii de *S. aureus* β-hemolitică, cu aspect de "săgeată", în timp ce pe restul lungimii striului de cultură hemoliza este incompletă sau chiar absentă (Pasteur Inst., 2000). Testul CAMP este utilizat pentru identificarea tulpinilor de *Str. agalactiae* şi *Listeria monocytogenes,* producătoare de factori CAMP (Murphy, 1952; Groves şi Welshimer, 1976; Wilkinson, 1977). Tulpinile de *Str. agalactiae* pot fi utilizate pentru confirmarea tulpinilor de *Clostridium perfringens* în testul numit CAMP inversat, în care factorul CAMP produs de streptococul de grup B permite evidenţierea sfingomielinazei produse de *Clostridium* (Gubash, 1978; Hansen şi Elliot, 1980; Buchanan, 1982) (fig. 356).

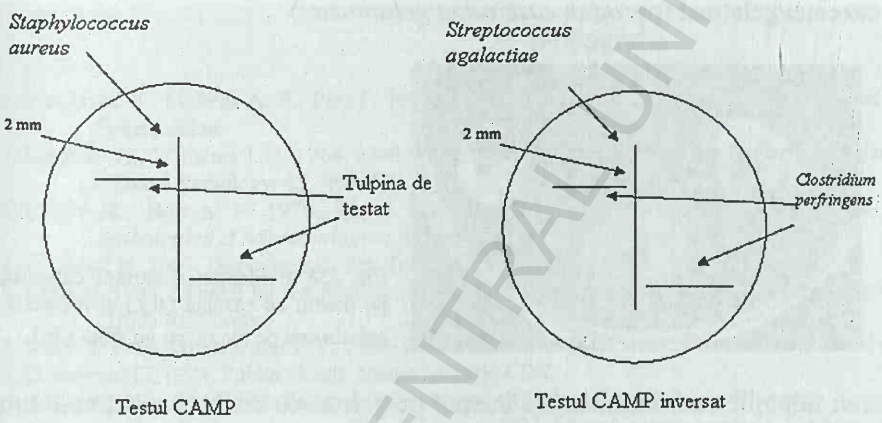


Fig. 356a. Reprezentarea schematică a tehnicii testului CAMP.

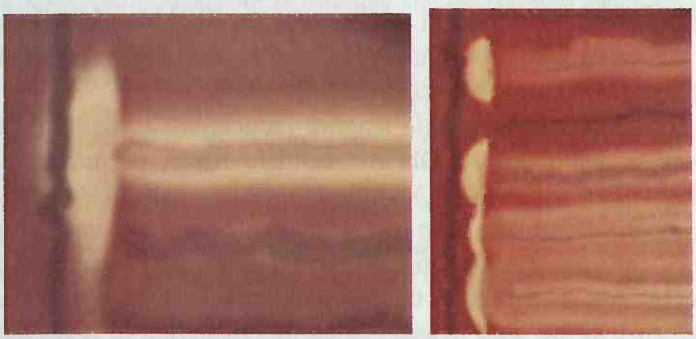
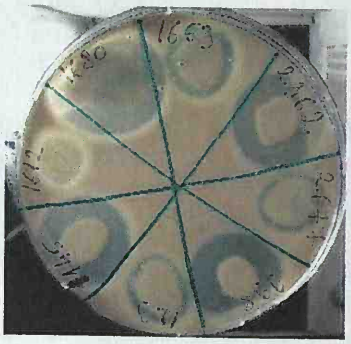


Fig. 356b. Evidenţierea factorului CAMP la tulpini de *Str.agalactiae* şi *V. cholerae.*

Lecitinazele şi *lipazele* sunt enzime implicate în patogeneza unor tulpini bacteriene prin capacitatea lor de a induce formarea porilor în membrana celulelor eucariote, prin alterarea conţinutului lipidic al acesteia. Astfel, în cursul infecţiei aceste enzime pot acţiona ca toxine formatoare de pori, factori de virulenţă ce determină diareea apoasă caracteristică infecţiei holerice. Pentru evidenţierea *producerii de lecitinază*, tulpinile sunt însămânţate în spot pe mediu solid cu

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

gălbenuş de ou şi incubate la 37°C până la 7 zile. Prezența unei zone transparente în jurul ariei de creştere indică producerea lecitinazei (fig. 357a). Pentru evidențierea *producerii lipazei*, tulpinile sunt însămânțate în spot pe mediu solid cu adaos de Tween 80 în concentrație finală de 1% şi incubate la 37°C până la 7 zile. Prezența unei zone opace (de precipitare) in jurul ariei de creştere indică producerea de lipază (fig. 357b).



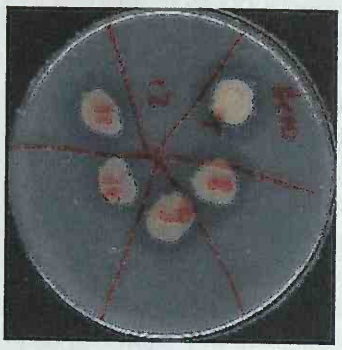


Fig. 357a. Evidențierea acțiunii lecitinazelor pe mediu cu gălbenuş de ou (stg.) şi respectiv, pe mediu cu lecitină (dr.).

Fig. 357b. Evidențierea acțiunii lipazelor, pe mediu cu TWEEN-80.

Proteazele sunt enzime extracelulare cu specificitate scăzută, care hidrolizează proteinele la peptide şi aminoacizi, implicate în distrugerea țesuturilor gazdei şi în progresia infecției. Pentru evidențierea *producerii proteazelor*, tulpinile sunt însămânțate în spot pe medii solide cu cazeină sau cu gelatină, şi incubate 24 h la 37°C. Prezența unei zone de precipitare/clarificare în jurul ariei de creştere indică proteoliza cazeinei/gelatinei (prezența *cazeinazei/gelatinazei*).

Fig. 358. Evidențierea acțiunii cazeinazei pe mediu cu cazeină (stg.) şi respectiv a gelatinazei pe mediu cu gelatină (dr.).

Producerea DN-azei: tulpinile sunt însămânțate în spot pe geloză cu ADN şi menținute timp de 24 h la 37°C. După incubare, peste culturile în spot se adaugă câteva picături de soluție HCl 1N, clarificarea zonei în jurul ariei de creştere fiind înregistrată ca reacție pozitivă (fig. 359).

Nucleazele stafilococice sunt enzime termorezistente, elaborate de tulpinile patogene coagulazo-pozitive în proporție de 90–95%.

În eneral, DN-azele asigură reducerea vâscozității secrețiilor în care se acumulează ADN din celulele lizate, permițând diseminarea bacteriilor şi, totodată, conferă speciilor producătoare un avantaj competitiv, furnizându-le mononucleotide pentru propriile sinteze.

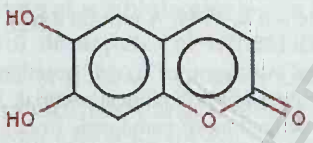
Mucinaza joacă un rol foarte important în virulența unor tulpini bacteriene şi reprezintă un complex enzimatic care scindează mucina gastrică, favorizând accesul microorganismelor la receptorii specifici de pe suprafața celulelor epiteliale. În acelaşi timp produşii de hidroliză ai mucinei „tapetează" celulele bacteriene şi le protejează de acțiunea nocivă a pH acid şi a altor molecule implicate în apărarea anti-infecțioasă la nivelul mucoaselor. *Pentru evidențierea producerii mucinazei* tulpinile sunt însămânțate în spot pe mediu cu mucina din stomac de porc şi incubate la 35°C până la 7 zile, activitatea

Fig. 359. Evidențierea acțiunii DN-azei pe mediu cu ADN, după inundarea plăcii cu HCl.

enzimatică fiind determinată prin prezenta unui halou transparent în jurul ariei de creştere, accentuată după inundarea plăcii cu soluţie Lugol 1:2:300 (fig. 360).

Hidroliza esculinei. Esculina (un glucozid) este hidrolizată la glucoză + esculetol. În prezenţa citratului de Fe ($FeC_6H_5O_7$) (FeIII) din mediu, esculetolul eliberat sub acţiunea unei β-galactozidaze generează formarea unui precipitat negru de esculetină ferică, compus cu Fe, fenolic cu structură chimică incertă. S-a demonstrat că esculetolul poate fixa chelatorii de fier (de tipul transferinei), furnizând astfel ionii de Fe necesari celulelor bacteriene pentru activarea unor gene şi exprimarea unor factori de virulenţă (în speţă, toxina holerică). Rolul esculetolului este foarte important la bacteriile patogene extracelulare, deoarece în mediul extracelular, cantităţile de Fe liber sunt foarte reduse, majoritatea ionilor de Fe circulând în forma legată.

Fig. 360. Evidenţierea mucinazei pe mediu cu mucină de porc.



Esculetol

Bibliografie

1. Van Dyck E., Meheus A. Z., Piot P. 1999. *Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases*. Geneva, World Health Organization
2. Leigh D. A., Williams J. D. 1964. Method for the detection of significant bacteriuria in large groups of patients. Journal of Clinical Pathology. 17: 498–503.
3. Kilian M., Borrow P. 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. 1. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, Section B 84:245–251
4. O' Farell N. 2002. Donovanosis. Sex Transm Infect;78:452–457
5. Begg N. 1994. Manual for the management and control of diphtheria in the European region. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe.
6. Tenover F. C., Hirschmann J. V. 1990. Interpretation of Gram stains and other common microbiologic slide preparations.
7. Hammond G. 1978. Public Health Image Library, CDC
8. Buiuc D., Negut M. 1999. Tratat de Microbiologie Clinica, *Ed. Medicala*, Bucureşti
9. Mihăescu Gr., Chifiriuc Carmen, Dițu Lia Mara, 2007. Microbiologie generală, *Editura Universității,* Bucureşti
10. Mihăescu Gr., Chifiriuc Carmen, Dițu Lia Mara, 2007, Antibiotice şi substanţe chimioterapeutice antimicrobiene, Editura Academiei Române
11. Mihăescu Gr., Chifiriuc Carmen, Ciugulea I., 2005, Toxine şi substanţe potenţial toxice, Editura Academiei Române
12. Mihăescu Gr. Microbiologie generală şi Virologie, 2000, *Editura Universității,* Bucureşti.
13. Lazar V. 2003. Aderenţa microbiană, *Ed. Academiei Române*
14. Pasteur Institute. 2000. Cours de Bacteriologie Medicale. Travaux Pratiques. Milieux de culture et techniques, *Institut Pasteur Centre de l'Enseignement,*
15. Ordinul MSP 1301/2007 /MO 617/06.11.2007 privind aprobarea Normelor privind funcţionarea laboratoarelor de analize medicale
16. Standardul 15189 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă
17. Contract- cadru privind condiţiile acordării asistenţei medicale în cadrul sistemului de asigurări sociale de sănătate pentru anul 2009
18. Ordinul MSP 1301/20.07.2007; SECŢIUNEA a 9-a. Managementul calităţii. Controlul intern de calitate şi evaluarea externă a calităţii în laboratorul de analize medicale.
19. Bâlbâie V. şi Pozsgi N. 1985. Bacteriologie medicală volumul I şi II, Ed. medicală
20. Buiuc D. şi Neguţ M. 2009. Tratat de microbiologie clinică, ed. A III-a, Ed. medicală
21. Murray P. M. 1998. Pocket guide to Clinical Microbiology; 2nd Ed. ASM-Press, Washington DC
22. Murray P. M. 2007. Clinical Manual of Microbiology
23. Isenberg H. D. 2004. Clinical Microbiology –Procedures Handbook; Second Edition, vol. 1–3
24. CLSI. 2010. Performance Standards for Antimicribial Susceptibility Testing; Clinical and Laboratory Standard Institute

25. MICROBIOLOGICS. Asigurarea calității microorganismelor. Păstrare • Procesare • Întreținere
26. WHO. 2003. Basic laboratory procedures in Clinical bacteriology, 2nd Ed.
27. Hopkins B. T. 2005. Laboratory Notes. Guide to Laboratory and Diagnostic tests
28. REMIC. 2008. Referéntiel en Microbiologie médicale, Société Française de Microbiologie, Collection Vivactis plus éditions
29. BE EN ISO 8402/1995. Quality management and quality assurance. Vocabulary.
30. ISO Guide 30:1992. Terms and definitions used in connection with reference materials
31. EA- 04/10. 2002. Accrediation for microbiological laboratories
32. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
33. OUG 65/2005. Ordonanta de urgenta privind modificarea si completarea Legii nr. 53/2003 – Codul muncii, oug nr. 65/2005
34. L53/2005. Proiect de Lege pentru aprobarea Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 8/2005 privind modificarea și completarea Legii nr.67/2004 pentru alegerea autorităților administrației publice locale
35. ISO/TS 11133-1:2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
36. USP – US Pharmacopeia. Reference Standards
37. Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition http:// www.accessmedicine.com
38. Buchanan A. G. 1982. Clinical laboratory evaluation of a reverse CAMP test for presumptive identification of *Clostridium perfringens*. J. Clin. Microbiol. 14:761–762.
39. Christie N. E., Atkins N. E., Munch-Petersen E. 1944. A note on a lytic phenomenon shown by group B *Streptococcus*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 22:193–195.
40. Darling, J. F. 1975. Standardization and evaluation of CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. J. Clin. Microbiol. 1:171–174.
41. Groves R. D., Welshimer H. J. 1977. Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three in vitro reactions. J. Clin. Microbiol. 5:559–563.
42. Gubash S. 1978. Synergistic hemolysis phenomenon shown by an alpha-toxin producing *Clostridium perfringens* and streptococcal CAMP factor in presumptive streptococcal grouping. J. Clin. Microbiol. 6:480–488.
43. Hansen M. V., Elliott L. F. 1980. New presumptive test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test. J. Clin. Microbiol. 12:617–619.
44. Munch-Petersen E., Christie R. 1947. The effect of the interaction of Staphylococcus b toxin and group B streptococcus substance on red blood corpuscles and its use as a test for the identification of *Streptococcus agalactiae*. J. Pathol. Bacteriol. 59:367–371.
45. Murphy J. M., Stuart O. M., Reed F. I.. 1952. An evaluation of the CAMP test for the identification of *Streptococcus agalactiae* in routine mastitis testing. Cornell Vet. 42:133–147.
46. Wilkinson H . W. 1977. CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 6:42–45.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16. TERAPIA ANTIMICROBIANĂ

Antibioticele sunt substanțe chimice cu greutate moleculară mică, produse de microorganisme prin procese de biosinteză, semisinteză sau prin sinteză chimică, care în concentrație mică inhibă multiplicarea sau omoară microorganismele (Mihăescu şi colab., 2008).

Datorita specificității lor de acțiune, antibioticele manifestă eficiență diferită față de diferite specii microbiene; totalitatea speciilor microbiene sensibile la un anumit antibiotic defineşte ***spectrul de activitate*** al antibioticului respectiv (fig. 361). În funcție de numărul şi diversitatea speciilor microbiene afectate, spectrul de activitate al antibioticelor poate fi:

- *larg* (de exemplu, spectrul de acțiune al tetraciclinei este reprezentat de bacterii Gram negative, inclusiv chlamidii şi rickettsii şi specii Gram pozitive; penicilinele sunt active în special față de specii Gram pozitive, dar şi Gram negative, inclusiv chlamidii; nitrofuranii, rifampicina, sulfamidele sunt active pe un număr mare de specii bacteriene Gram pozitive şi Gram negative şi pe bacteriile acido-alcoolo-rezistente);
- *îngust* (novobiocina este activă față de bacteriile Gram pozitive, mai ales stafilococi, dar şi pe coci şi bacili Gram negativi, cum ar fi *Haemophilus sp.* şi *Pasteurella* sp.; glicopeptidele, bacitracina, pe bacterii Gram pozitive);
- *limitat* (nitroimidazolii sunt activi faşă de microorganismele anaerobe).

Chiar în cadrul aceleiaşi specii microbiene, pot exista diferențe mari de sensibilitate a diferitelor tulpini față de un anumit antibiotic, astfel că stabilirea tratamentului cu antibiotice în clinică necesită izolarea agentului etiologic al infecției respective (mai ales dacă acesta aparține unor genuri şi specii supuse fenomenului de dobândire a rezistenței clinice) şi determinarea spectrului său de sensibilitate la antibiotice.

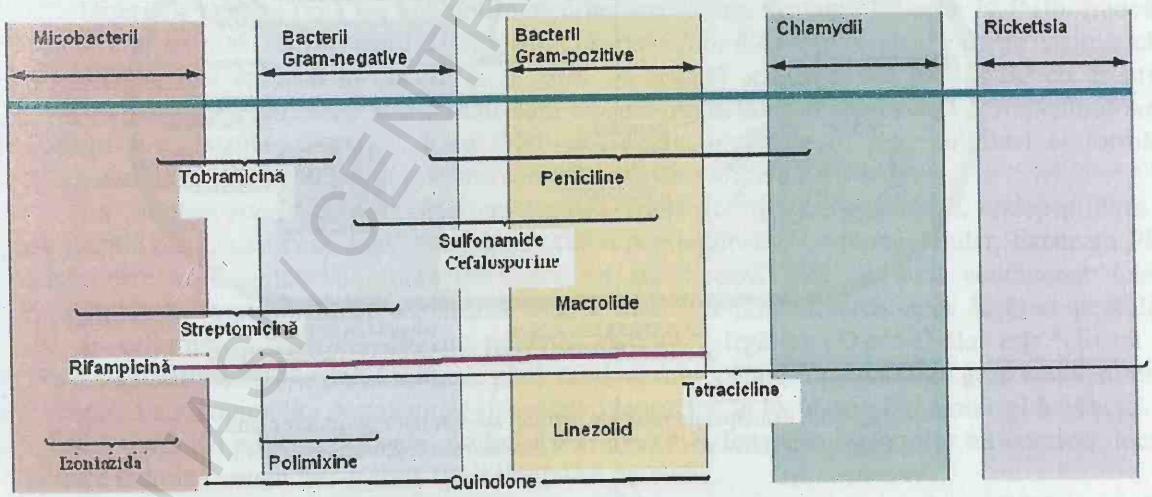


Fig. 361. Reprezentarea spectrului de activitate al principalelor clase de antibiotice (http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm).

Activitatea antimicrobiană *in vivo* este mult mai complexă, implicând pe lângă antibiotic şi agentul microbian, şi factorul gazdă. Astfel, în organismul gazdă o serie de factori locali (presiunea parțială a O_2, pH etc.) influențează activitatea antibioticului. Datorită multiplelor mecanisme de apărare ale gazdei, microorganismele au o rată metabolică redusă, ceea ce scade eficiența

antibioticelor. Pe de altă parte, antibioticele se absorb din tractul intestinal şi se distribuie inegal în diferite ţesuturi şi umori ale organismului şi foarte puţine realizează concentraţii active în SNC sau în interiorul celulelor eucariote. De asemenea, este foarte dificil de menţinut concentraţia activă a antibioticului pe o perioadă mai lungă de timp, de aceea intervalul dintre doze trebuie respectat riguros. Unele antibiotice au efect postantibiotic (de exemplu carbapenemii faţă de bacilii Gram negativi), şi pot modula răspunsul inflamator, în sensul cronicizării reacţiei inflamatorii datorită acumulării de fragmente bacteriene. De asemenea, antibioticele pot determina apariţia unei stări de disbioză, care favorizează suprainfecţia cu tulpini microbiene rezistente (*Pseudomonas sp., Clostridium difficile, Candida albicans*). Antibioticele exercită efecte toxice asupra gazdei şi pot induce reacţii de hipersensibilitate. Adiministrarea empirică a antibioticelor, înainte de izolarea şi identificarea agentului infecţios şi de determinarea *pattern*-ului de sensibilitate la antibiotice, poate masca o infecţie gravă şi poate conduce la dezvoltarea rezistenţei la antibiotice în populaţiile microbiene. Asocierea a două sau mai multe substanţe antimicrobiene este recomandată în cazul infecţiilor foarte severe, în cazul infecţiilor cronice, pentru evitarea apariţiei mutantelor rezistente (de exemplu, *M. tuberculoris*), în infecţiile mixte, pentru obţinerea unui sinergism de acţiune şi a unui efect puternic bactericid (de exemplu, aminoglicozide şi ß-lactamice, trimetroprim şi sulfametoxazol, amfotericina şi flucitozina, inhibitorii de ß-lactamaze şi ß-lactamicele). Efectul antagonist poate apărea atunci când un antibiotic bacteriostatic este asociat cu unul bactericid.

Medicamentele antimicrobiene acţionează pe următoarele căi (fig. 362):

- inhibiţia sintezei peretelui celular;
- inhibiţia funcţiilor membranei celulare;
- inhibiţia sintezei proteinelor la diferitele trepte (traducerea şi transcrierea materialului genetic);
- inhibiţia sintezei acizilor nucleici;
- blocarea unei căi metabolice prin inhibiţie competitivă.

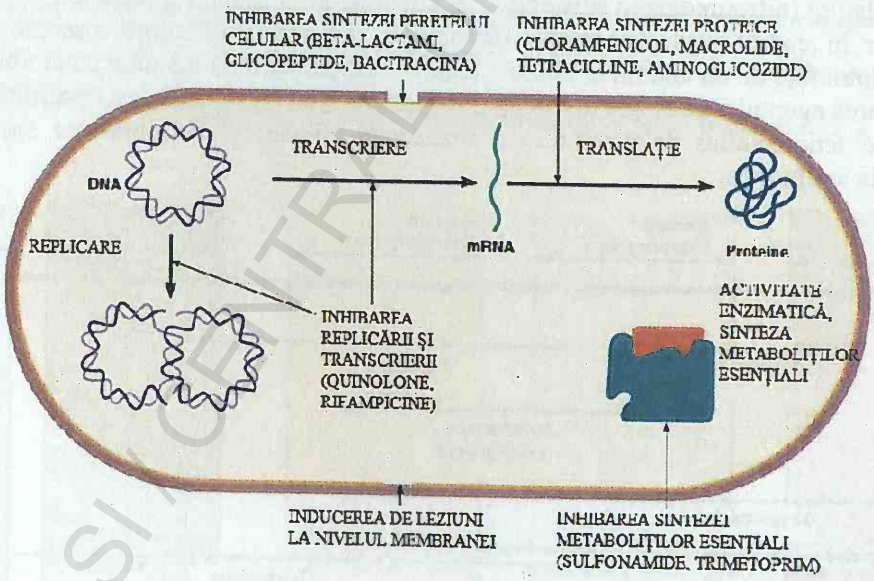


Fig. 362. Principalele ţinte ale acţiunii substanţelor antimicrobiene (http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm).

Inhibiţia sintezei peretelui celular. Antibioticele ß-lactamice

Peretele mureinic este o cu o structură închisă, legată covalent, care permite adăugarea noilor unităţi pentru creştere. Straturile de mureină sunt adăugate secvenţial pe faţa externă a membranei citoplasmatice, în proximitatea ei, chiar sub stratul mureinic anterior. Pe măsură ce noile straturi de mureină sunt adăugate, cele vechi sunt deplasate spre exterior şi sunt supuse unor forţe de întindere tot mai mari, până la limita elasticităţii lor. În acest punct, autolizinele sunt extruzate din celulă şi hidrolizează stratul cel mai tensionat. Fragmentele mureinice sunt eliberate şi uneori chiar reutilizate.

Sinteza *mureinei* are loc în 3 stadii. *În primul stadiu*, în citoplasmă, se sintetizează precursorii solubili cu greutate moleculară mică – UDP-GlcAc şi UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mezoDap-D-Ala-D-Ala. Unii agenţi antibacterieni interferă cu treptele timpurii ale sintezei peretelui. Iniţial, la UDP-MurNAc este adăugat un tripeptid, la care va fi legat dipeptidul D-ala-D-ala, sintetizat de o enzimă specifică. D-ala este produsă din L-ala sub acţiunea alanin-racemazei.

Stadiul al doilea al sintezei peretelui celular este catalizat de enzime legate de membrană. Regiunea non-nucleotidică a moleculei precursoare sintetizată anterior (intermediarul N-acetil glucozamina şi acidul N-acetil muramic-pentapeptid) este ataşată la un *purtător lipidic* (undecaprenol-pirofosfat, denumit bactoprenol), generând lipidul I. Acesta este integrat în membrană şi modificat ulterior prin adăugarea GlcNac şi pentaglicinei. Se formează undecaprenol pirofosfat-MurNac (-L-Ala-D-Gln-(NH_2-(Gly_5)L-Lys-D-Ala-D-Ala)-(β1-4)-GlcNac (lipidul II) şi este translocat prin membrana plasmatică. Lipidul II are rol de substrat pentru reacţia de *transglicozilare*, polimerizând catenele glican ale peretelui celular bacterian. Rezultă astfel *dizaharidul repetitiv (MurNac-GlcNac)n.* Purtătorul lipidic are rol de punct de ataşare de membrană pentru precursori şi permite transportul subunităţilor prin interiorul hidrofob al membranei citoplasmatice, la suprafaţa celulei.

În stadiul al treilea al sintezei, subunităţile peptidoglicanice sunt polimerizate prin inserţia în peretele celular existent. Polimerizarea se face prin transferul peptidoglicanului nou, de la purtătorul său localizat în membrană, la peptidoglicanul parietal preexistent, printr-o reacţie de transpeptidare ce implică lanţurile peptidice ale ambilor polimeri, dintre care unul trebuie să posede resturi D-ala-D-ala terminale. Reacţia este catalizată de un complex de enzime secretate prin membrană. Ele sunt autolizine, transglicozilaze şi transpeptidaze, toate cu acţiune degradativă strict controlată asupra peretelui celular, permiţând creşterea şi diviziunea celulei.

Polimerizarea glucidului şi legarea încrucişată a catenelor tetrapeptidice, denumită reacţia de *transpeptidare*, este catalizată de *proteine-enzime care leagă penicilina* (*penicillin binding proteins* - PBP), localizate la nivelul membranei citoplasmatice şi în spaţiul periplasmic.

Dizaharid-pentamuropeptidul extruzat prin membrana citoplasmatică, este inserat în reţeaua mureinică în creştere. Peptidul se leagă de un alt peptid ce aparţine altui lanţ. Legarea celor două *dizaharid-pentamuropeptide* prin secvenţele terminale se face cu consum de energie furnizată de reacţia de transpeptidare şi pierderea D-ala terminală a uneia dintre cele două muropeptide. Rezultă astfel un nonamuropeptid (penta-tetrapeptid). Restul D-ala al celuilalt muropeptid este adeseori hidrolizat şi rezultă un *octa-* sau chiar un *heptamuropeptid.*

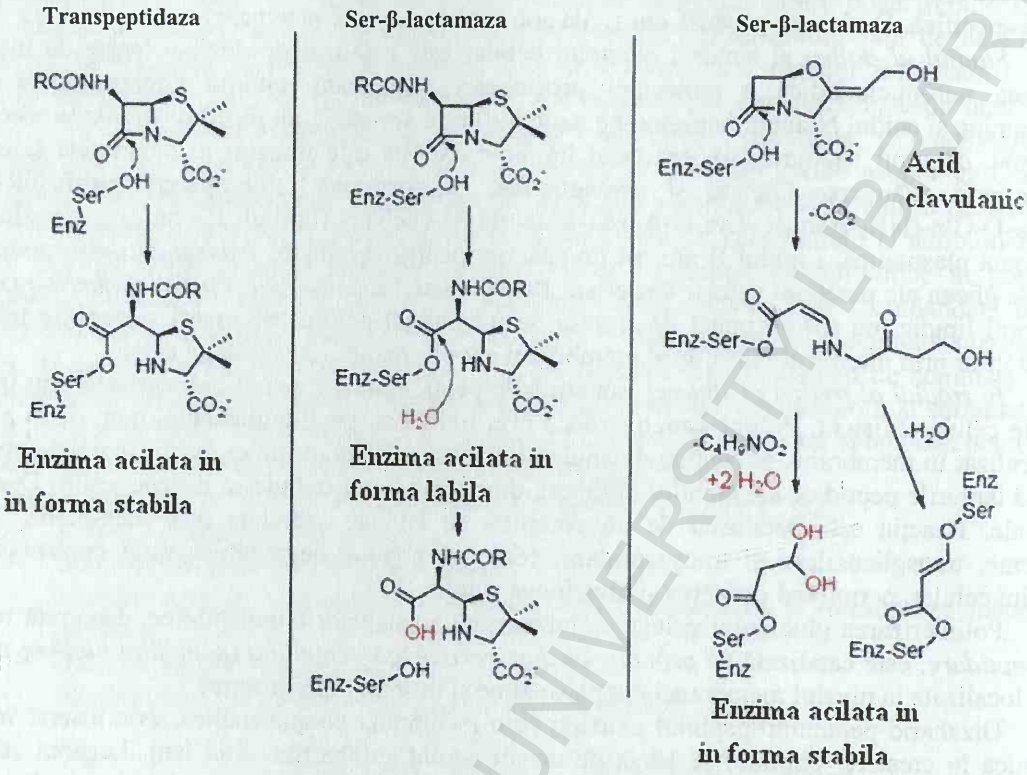
Diferitele enzime ţintă ale antibioticelor ß-lactamice sunt denumite generic *PLP* (lb. franceză – *protein liant les penicillines*) sau *PBP* (lb. engleză *-penicillin binding protein*). Funcţia enzimatică a fiecărei PBP a fost studiată în detaliu la *E. coli.* La această specie există patru PBP cu greutate moleculară mare (PBP 1a, 1b, 2 şi 3). Toate sunt enzime bifuncţionale: catalizează *transpeptidarea* şi *transglicozilarea* peptidoglicanilor. Rolul PBP ca enzime implicate în procesul final al formării peretelui mureinic a fost descoperit prin marcare cu penicilină G radioactivă.

La *Staphylococcus aureus*, PBP au funcţii fiziologice de transpeptidaze, endopeptidaze şi carboxipeptidaze. Unele PBP sunt esenţiale pentru supravieţuirea şi creşterea celulei. Existenţa PBP esenţiale este argumentată de mutantele care nu sintetizează PBP şi sunt condiţionat letale. Transpeptidazele (transamidaze) acţionează asupra mureinei prin clivarea unor legături peptidice critice şi reformarea legăturii cu alt partener peptidic: legătura D-ala-D-ala este clivată şi tetramuropeptidul rămâne legat de enzimă, până când alt muropeptid furnizează un grup amino al unui rest de acid diaminopimelic. Autolizinele (hidrolaze) leagă apa în locul grupării amino şi în reacţia de hidroliză a mureinei eliberează D-ala. Acţiunea lor împiedică formarea legăturilor transversale locale şi distruge mureina numai într-o zonă strict limitată a peretelui.

Baza acţiunii antibioticelor β-lactamice constă în aceea că substratul transpeptidării – *capătul carboxil al D-ala din structura intermediarului dizaharid-tetrapeptid* – are omologie structurală strânsă cu inelul β-lactamic (fig. 363). Antibioticele β-lactamice inhibă astfel ultima etapă a sintezei peptidoglicanilor, adică formarea *punţilor interpeptidice.*

Antibioticele ß-lactamice acţionează ca pseudosubstraturi şi *acilează* situsurile active ale *transpeptidazelor* PBP, care devin astfel incapabile să catalizeze reacţiile de polimerizare ale subunităţilor mureinice. Reacţia de acilare a PBP este foarte lent reversibilă. Enzimele PBP deacilate

devin incapabile să catalizeze reacțiile de legare încrucișată a peptidelor. Complexul antibiotic-PBP stimulează eliberarea autolizinelor, cu efect degradativ asupra peretelui celular, care are drept consecință liza osmotică a celulei bacteriene.



Antibioticele ß-lactamice sunt divizate în 4 subclase: peniciline, cefalosporine, monobatcami şi carbapenemi. Antibioticele β-lactamice inhibă ultima etapă a sintezei peptidoglicanului, adică formarea punților interpeptidice. Aceşti compuşi prezintă o analogie structurală cu dipeptidul terminal D-ala-D-ala, care face parte din pentapeptidul mureinic.

Penicilina G este antibioticul de elecție în cazul infecțiilor cu streptococi, pneumococi, meningococi, spirochete, clostridii, bacili aerobi Gram pozitivi, streptococi sensibili la penicilină, gonococi şi actinomicete, enterococi (pentru un efect bactericid, acest ultim caz necesită asocierea cu un aminoglicozid).

Benzatin penicilina G (moldamin sau penicilina retard) este o sare geu solubilă care administrată intramuscular asigură o concentrație activă pe o durată lungă de timp. De exemplu, o singură doză de 1.2 milioane UI (0.7 g) este suficientă pentru tratamentul faringitei streptococice cu streptococ de grup A şi al sifilisului primar. Doze succesive administrate odată la 3–4 săptămâni asigură profilaxia reinfecției cu streoptococi de grup A la pacienții cu febră reumatică.

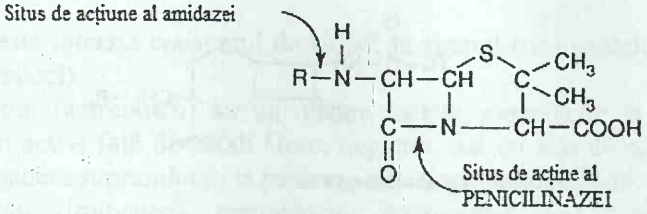
Stafilococii producători de ß-lactamază necesită tratament cu peniciline rezistente la ß-lactamaze (oxacilină).

Amoxicilina administrată oral se absoarbe mai bine decât penicilina şi asociată cu acidul clavulanic este extrem de eficientă în terapia infecțiilor cu *H influenzae* şi a altor specii producătoare de ß-lactamază. Ticarcilina este foarte activă față de bacilii Gram negativi, fiind administrată în sepsisul cu bacterii Gram negative, asociată cu un aminoglicozid. Piperacilina este foarte activă față de *Pseudomonas sp.*

Penicilinele au toxicitate foarte scăzută comparativ cu alte clase de antibiotice, efectele secundare fiind rezultatul reacțiilor alergice la penicilină (alergenul major este acidul peniciloic, rezultat din hidroliza acidului 6-aminopenicilanic).

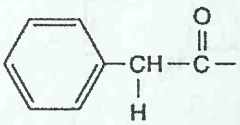
În doze foarte ridicate, pot produce ocazional iritații ale SNC (encefalopatie, delir, convulsii), sângerări, nefrită interstițială sau diaree.

UMF "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

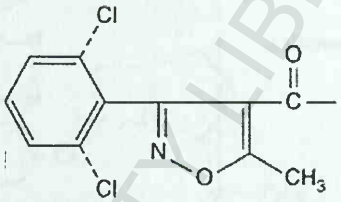


Acid 6 amino-penicilanic

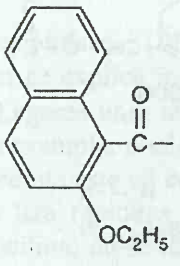
ÎN FUNCȚIE DE NATURA RADICALULUI, AU REZULTAT DIFERITE SUBCLASE DE PENICILINE



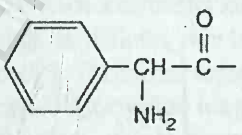
Penicilina G (benzil-penicilina)



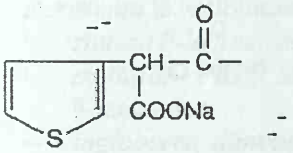
Oxacilina (fără atomi de Cl), cloxacilina (cu un atom de Cl), flucloxacilina (cu un atom de Cl si unul de F), dicloxacilina (2 atomi de Cl)



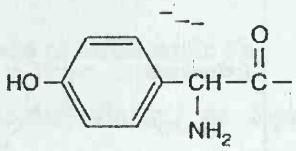
Nafcilina



Ampicilina



Ticarcilina



Amoxicilina

Cefalosporinele de generația I (CG I) (cefalotin, cefazolin, cefalexin etc) sunt foarte active față de cocii Gram pozitivi, mai puțin enterocii și stafilococii producători de ß-lactamază și moderat active față de *E coli, Proteus* sp. și *Kebsiella* sp (fig. 364).

Cefalosporinele de generația a II-a (CG II) (cefamandol, cefuroxim, cefaclor, cefoxitin, cefotetan, cefprozil) au un spectru similar cu al celor precedente, dar sunt active față de *Proteus* sp. și *Kebsiella* sp., dar nu asupra pseudomonadelor (fig. 363).

Cefalosporinele de generația a III-a (CG III) (cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon, cefotetan, ceftizoxim, cefoperazon, cefixim) au activitate redusă asupra cocilor Gram pozitivi, exceptând *S. pneumoniae*; enterococii sunt rezistenți în mod natural. În schimb, sunt foarte active față de bacilii Gram negativi, inclusiv *P. aeruginosa* și *Burkholderia pseudomallei* (fig. 363).

De asemenea, pot traversa bariera hematoencefalică, cefotaximul, ceftriaxona și ceftizoximul fiind administrate intravenos pentru tratamentul sepsisului și meningitei produse de bacterii Gram negative.

Cefalosporinele de generația a IV-a (CG IV) (cefpiroma, cefepimul) prezintă activitate față de tulpinile de *Enterobacter* și *Citrobacter* rezistente la celelalte cefalosporine, față de *P. aeruginosa,* streptococi și stafilococi sensibili la nafcilină (fig. 363).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

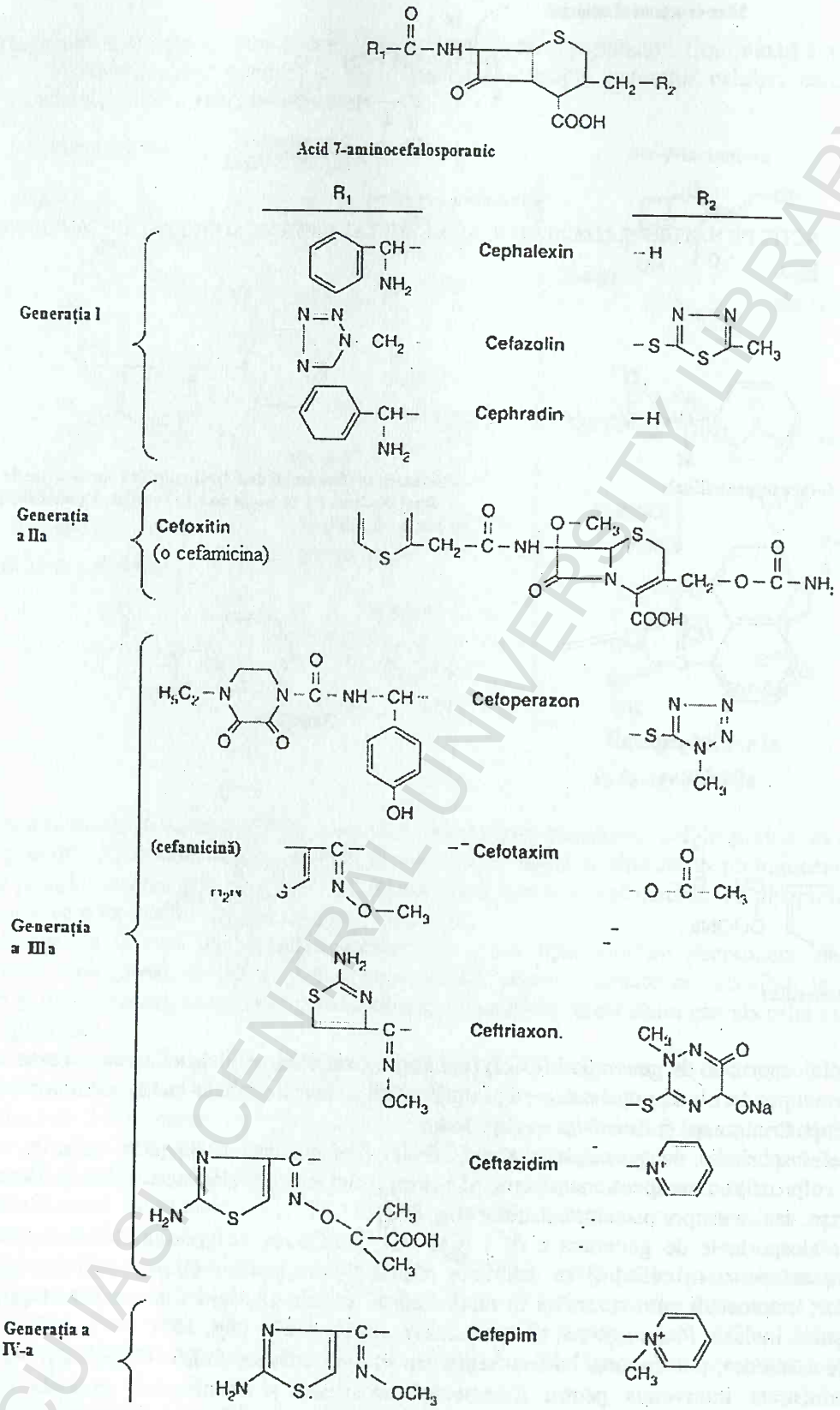


Fig. 363. Structura diferitelor cefalosporine, raport cu nucleul de bază 7 aminocefalosporanic (Brooks şi colab., 2007).

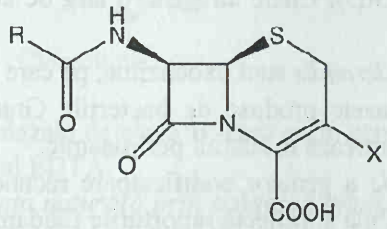
Cefalosporinele pot, de asemenea, genera reacţii de hipersensibilitate (alergia încrucişată cu penicilinele apare în 5% din cazuri), tromboflebită după administrarea intravenoasă, hipotrombinemie,

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

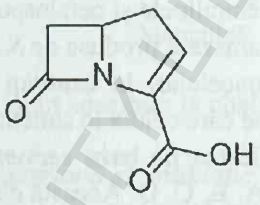
reacții disulfiram (este interzis consumul de alcool în timpul tratamentului), suprainfecții cu bacterii rezistente (ex. enterococi).

Monobactamii (aztreonam) au un nucleu lactam monociclic şi sunt rezistenți la acțiunea ß-lactamazelor, sunt activi față de bacili Gram negativi, dar nu față de coci Gram pozitivi şi bacterii anaerobe, care pot genera suprainfecții la pacienții tratați cu monobactami.

Carbapenemii (imipenem, meropenem, ertapenem) sunt rezistenți la acțiunea Ser-ß-lactamazelor, dar sunt inactivați de dihidropeptidaze la nivelul tubulilor renali şi de către metalo-ß-lactamaze. Sunt activi față de bacili Gram negativi, coci Gram pozitivi şi bacterii anaerobe, au o bună distribuție tisulară, traversează bariera hemato-encefalică.



Nucleu monobactamic



Nucleu carbapenemic

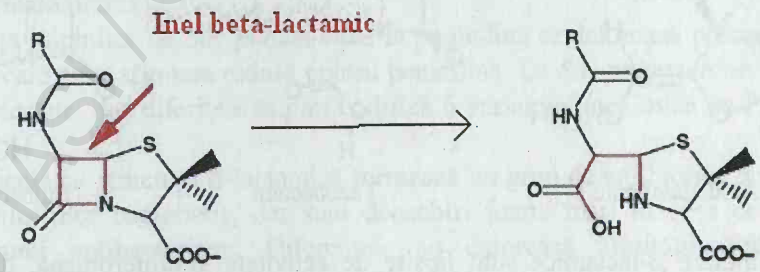
Transpeptidazele (PBP) sunt diferite la bacteriile Gram pozitive, Gram negative şi respectiv anaerobe, ceea ce explică într-o oarecare măsură diferențele activității antibacteriene a antibioticelor β-lactamice. Legarea unui antibiotic β-lactamic la PBP determină modificări morfologice ale celulei bacteriene: de exemplu, unele antibiotice se leagă de PBP implicată în formarea septului de diviziune.

Consecința este că celulele continuă să crească sub forma filamentelor lungi. Legarea de altă PBP duce la liza rapidă a bacteriei, deoarece peretele proemină şi celula se sparge. Mecilinam (amidino-penicilina) nu se leagă de PBP ale bacteriilor Gram pozitive şi nu influențează creşterea lor, iar aztreonam se leagă numai de PBP ale bacteriilor Gram negative şi nu inhibă creşterea celor Gram pozitive sau anaerobe.

Rezistența la antibioticele β-lactamice este conferită pe următoarele căi:

- *sinteza β-lactamazelor*;
- *mutațiile PBP*, al căror efect este reducerea afinității de legare cu antibioticele β-lactamice;
- *înglobarea diminuată* a antibioticelor datorată modificării de permeabilitate a peretelui celular sau activității pompelor de eflux.

Cel mai important mecanism de rezistență la antibioticele β-lactamice constă în sinteza enzimelor cu efect hidrolizant asupra antibioticelor. Unul dintre primele rapoarte cu privire la rezistența la antibiotice s-a referit la o tulpină bacteriană producătoare de β–lactamază, *o enzimă ce hidrolizează legătura β-lactamică* a acestei clase de antibiotice.



Penicilina

Acid peniciloic

Această legătură este esențială pentru activitatea antibioticelor β-lactamice, deoarece are rolul de analog al legăturii peptidice ce leagă D-ala terminală a peptidului de monomerul peptidoglicanic. β-lactamazele sunt enzime foarte eficiente: o singură moleculă poate hidroliza peste 100.000 de

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

molecule β-lactamice. β-lactamazele sunt o familie mare de enzime cu structură unitară, toate clivează ciclul β-lactamic şi inactivează antibioticul, dar diferă prin secvenţa aminoacizilor. Spectrul lor de activitate este restrâns. β-lactamazele s-au diversificat prin mecanismul mutaţiilor punctiforme ce se acumulează gradat în genele codificatoare.

Clasificarea β-lactamazelor. β-lactamazele s-au clasificat în funcţie de *substratul pe care-l hidrolizează*, de *sensibilitatea la inhibitori,* de *modul de producere* (constitutiv sau inductibil) şi de *localizarea* cromosomală sau plasmidială a genelor codificatoare.

β-lactamazele pot fi *penicilinaze* (cele care acţionează asupra penicilinelor) sau *cefalosporinaze* (hidrolizează cefalosporinele) (fig. 365). Unele au spectru larg de acţiune (cele care hidrolizează penicilinele şi cefalosporinele).

β-lactamazele produse de *S. aureus* şi *S. epidermidis* sunt exoenzime, pe care celula le elimină în mediul extracelular, în cantităţi mari. β-lactamazele produse de bacteriile Gram negative sunt endoenzime, pe care celula le sintetizează şi le concentrează în spaţiul periplasmic.

Clasificarea pe baza *secvenţei de nucleotide* a genelor codificatoare recunoaşte 4 clase de β-lactamaze: A, B, C, D. Această clasificare este stabilă şi reflectă raporturile fundamentale ce nu pot fi modificate de mutaţii.

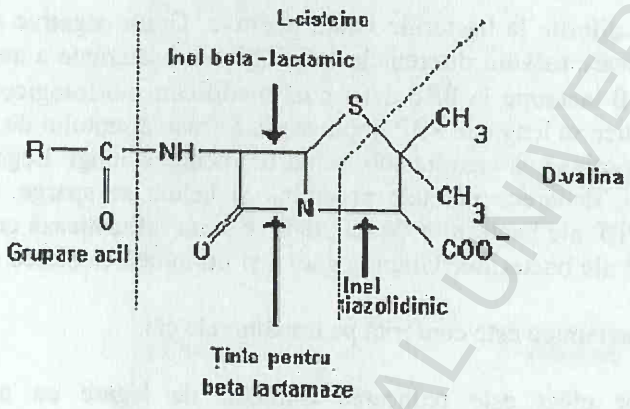
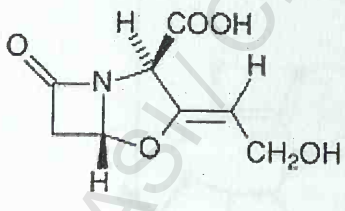


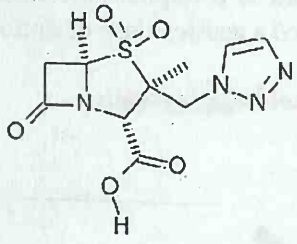
Fig. 365. Situsurile de acţiune a β-lactamazelor (indicate de săgeţi).

Enzimele din clasele A, C şi D au *serină* la situsul activ, iar cele din clasa B au *4 atomi de Zn.*

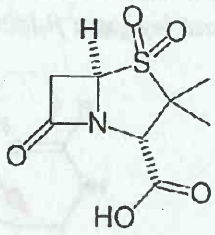
β-lactamazele claselor A şi B sunt foarte active faţă de benzil-penicilină, peniciline şi cefalosporine, şi respectiv carbopereni. Enzimele clasei C sunt în general inductibile, dar mutaţiile genelor codificatoare pot duce la supraexpresie. Enzimele clasei D sunt de tip *OXA*, deoarece hidrolizează preferenţial oxacilina.



Acid clavulanic



Tazobactam



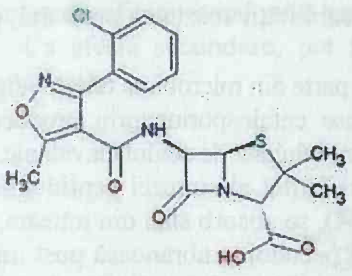
Sulbactam

Unele antibiotice ß-lactamice sunt lipsite de activitate antimicrobiană, dar leagă cu mare afinitate ß-lactamazele (acid clavulanic, tazobactam, sulbactam). Acestea sunt utilizate în asociaţie cu penicilinele sau cefalosporinele, pentru a extinde spectrul acestora asupra bacteriilor producătoare de ß-lactamaze codificate plasmidial, sensibile la inhibitori, inclusiv ß-lactamaze de spectru larg, care hidrolizează penicilinele şi cefalosporinele (CGI, CGII, CGIII şi CGIV).

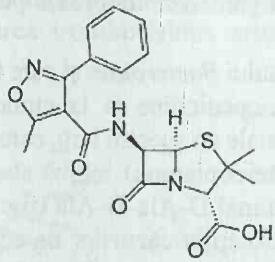
Unele ß-lactamaze, codificate de gene cromosomale, sunt rezistente la inhibitori de tipul acidului clavulanic.

UAIC IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

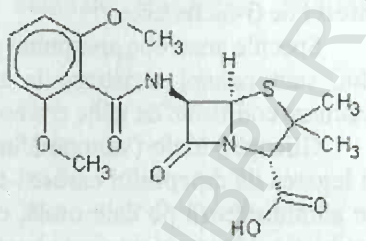
Penicilinele de tipul cloxacilinei, meticilinei, oxacilinei, nafcilinei sunt rezistente la acțiunea ß-lactamazelor, probabil datorită lanțului R lung care impiedică legare enzimei la nucleul ß-lactamic.



Cloxacilină



Oxacilină



Meticilină

ß-lactamazele de clasă B, care au în centrul catalitic Zn, sunt sensibile la chelatorii de metale bivalente de tipul EDTA.

Rezistența naturală prin scăderea afinității între țintă bacteriană și antibiotic. Micoplasmele, bacterii lipsite de perete celular, sunt natural rezistente la acțiunea antibioticelor care acționează la acest nivel (enzimele PBP). La alte specii bacteriene, PBP manifestă afinitate naturală slabă pentru antibioticele β-lactamice. Este cazul aztreonamului, inactiv asupra bacteriilor Gram pozitive și anaerobe stricte (Georgopapadakou, 1982), cefsulodinului inactiv față de enterobacterii (Barry, 1981) și cefalosporinelor și penicilinei M inactive față de enterococci.

Rezistența bacteriilor Gram pozitive la β-lactamice. Utilizarea în clinică pe scară largă a β-lactamilor, constituie factorul major selectiv care influențează sinteza β-lactamazelor de către agenții patogeni.

S. aureus este de obicei rezistent la benzil-penicilină, deoarece majoritatea tulpinilor izolate (80–95%) produc penicilinază.

Rezistența tulpinilor de *S. aureus* la meticilină se datorează legării antibioticului de către PBP, cu rol în sinteza peretelui celular. După legarea antibioticului, PBP se inactivează și sinteza peretelui celular este inhibată. Expresia genei este constitutivă sau inductibilă de către unele antibiotice β-lactamice. Rezistența la concentrațiile mici de meticilină se datorează producerii β-lactamazei, creșterii nivelului PBP sau diminuării afinității de legare a antibioticului de proteinele implicate în sinteza peretelui celular (PBP).

Rezistența la concentrațiile mari este totdeauna dependentă de sinteza unei noi variante biochimice a PBP (PBP_2), codificată de gena *mecA*, cu localizare cromosomală. Proteina PBP_2 are o afinitate mică pentru cele mai multe antibiotice β-lactamice. Expresia genei *mecA* este constitutivă sau inductibilă în prezența unor antibiotice β-lactamice. Rezistența la meticilină a tulpinilor de *S. aureus* (MRSA) este mai mare la 30°C decât la 37°C. În unele cazuri, singurele medicamente eficiente pentru tratamentul infecțiilor cu *S. aureus* rezistente la meticilină sunt antibioticele glicopeptidice (vancomicina).

Rezistența tulpinilor de *Str. pneumoniae* la penicilină se datorează prezenței PBP modificate, în special PBP_2, care au o afinitate redusă pentru penicilină. La *Str. pneumoniae*, β-lactamazele nu au fost niciodată detectate, dar diferitele tulpini codifică 6 variante biochimice de PBP: PBP 1a, 1b, 2a, 2b, 2x și PBP3.

Antibioticele cu structură β-lactamică formează un grup de antibiotice larg utilizate în clinică pentru terapia infecțiilor bacteriene, dar sunt deosebiri foarte mari în ceea ce privește spectrul și intensitatea acțiunii antibacteriene. Diferențele se datorează afinității diferite de legare cu transpeptidazele bacteriene, enzime implicate în sinteza peretelui celular sau cu enzimele care inactivează antibioticul (β-lactamaze).

Rezistența naturală la β-lactamice prin β-lactamaze la bacilii Gram negativi. La *Klebsiella*, rezistența este legată de sinteza unei β-lactamaze cromosomale cu spectru larg care antrenează rezistența la peniciline, anulată prin administrarea de inhibitori enzimatici ca acidul clavulanic, sulfbactam sau tazobactam.

RUSAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Morganella* sp., *Providencia* sp., *Ps. aeruginosa*, rezistența este determinată de producerea unei β-lactamaze cromosomale de tipul cefalosporinazei (Bush, 1995).

Rezistența celulelor de *Ps. aeruginosa* se datorează permeabilității scăzute a peretelui, precum și sintezei de β-lactamaze.

Speciile anaerobe aparținînd genului *Bacteroides* și care fac parte din microbiota tubului digestiv al omului, sunt natural rezistente la aminopeniciline și la numeroase cefalosporine prin producerea de β-lactamaze codificate de gene cromosomale cu spectru larg, care sunt inhibate de acidul clavulanic.

Glicopeptidele (vancomicina, teicoplanina) inhibă stadiul inițial al sintezei peptidoglicanului (prin legarea de dipeptidul carboxi-terminal D-Ala-D-Ala (fig. 364), se absorb slab din intestin, așadar nu se administrează pe cale orală, cu excepția cazurilor de colită pseudomembranoasă post tratament cu antibiotic. Vancomicina este bactericidă pentru stafilococi, clostridii și unii bacili. Se administrează intravenos în tratatmentul infecțiilor cu stafilococi rezistenți la meticilină, iar în endocardită sau sepsisul cu enterococi se asociază cu o penicilină.

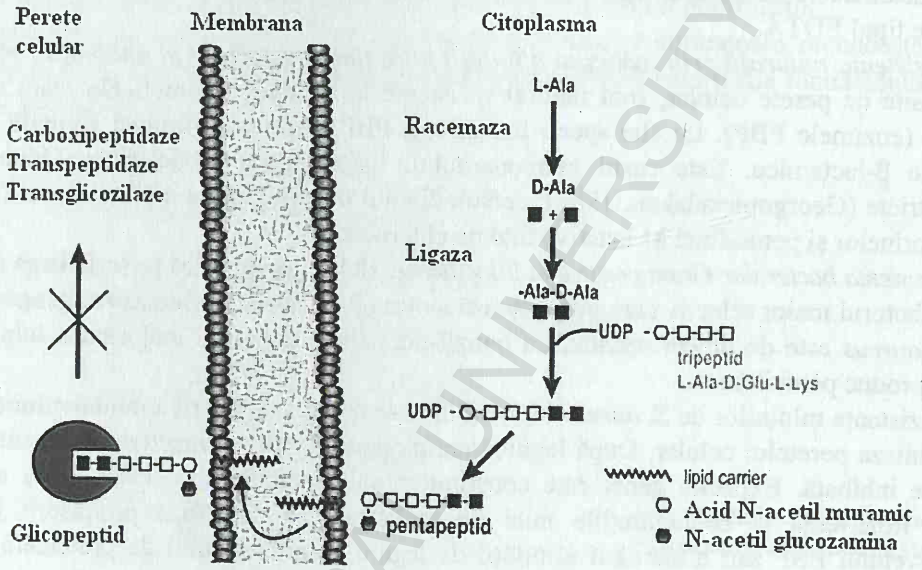
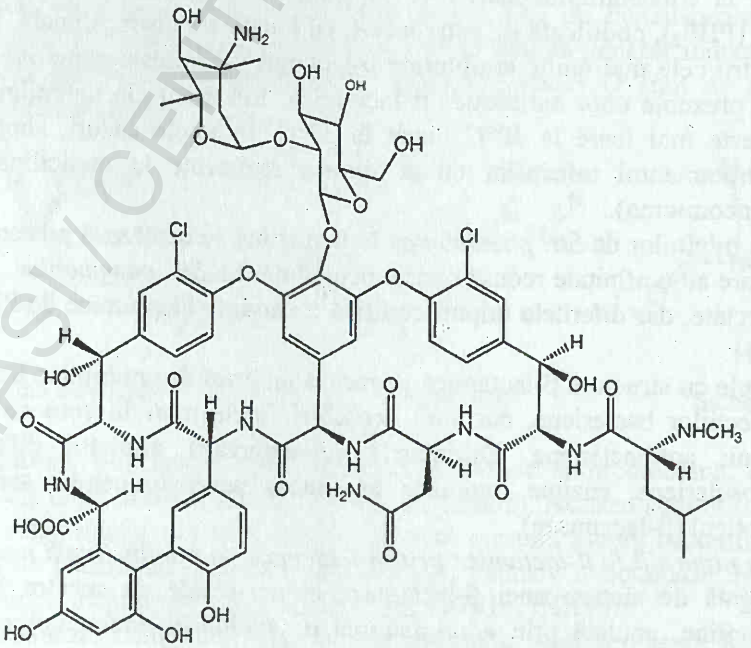


Fig. 364. Reprezentarea etapelor biosintezei peptido-glicanului și a mecanis-mului de acțiune a vanco-micinei (Courvalin, 2006).

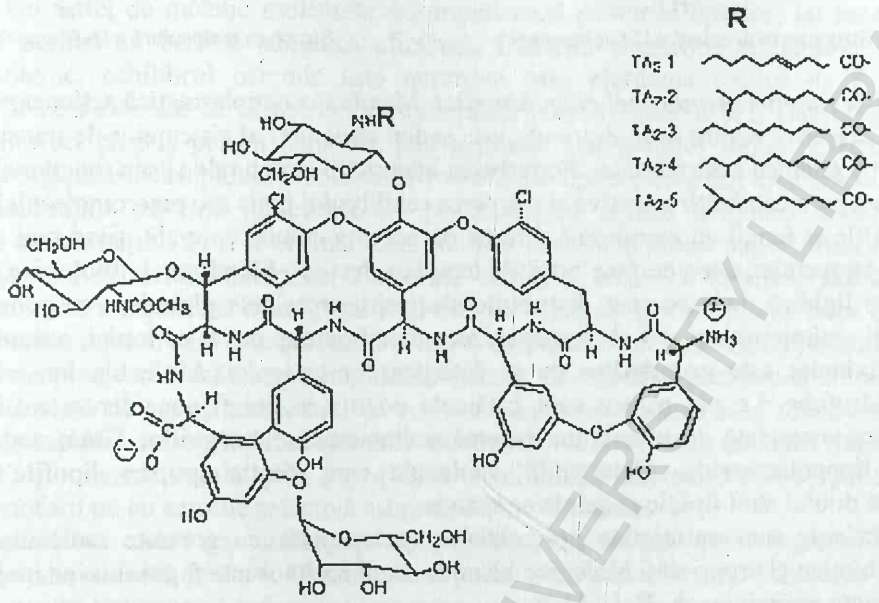


Structura vancomicinei

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Teicoplanina are structură similară cu cea a vancomicinei, este activă față de stafilococi, streptococi, enterococi şi alte bacterii Gram pozitive. Cocii Gram pozitivi (*Leuconostoc* sp.) şi *Lactobacillus* sp. sunt rezistenţi pentru că lanţul lateral al peptidoglicanului constă din D-alanil-D-lactat, care are afinitate mai mică pentru antibioticele glicopeptidice.

Ca efecte secundare, pot apărea tromboflebita, erupţii cutanate, leucopenie, ototoxicitate, nefrotoxicitate.



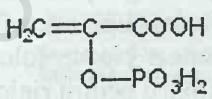
Structura teicoplaninei

Bacitracina (un peptid ciclic) împiedică defosforilarea moleculei lipidice purtătoare, ce transferă molecula de peptidoglican nou sintetizată, prin membrana celulei, în timpul sintezei peretelui celular. Este toxică pentru rinichi şi de aceea nu se administrează sistemic, dar se aplică local pentru tratamentul leziunilor tegumentare şi ale membranelor mucoase.

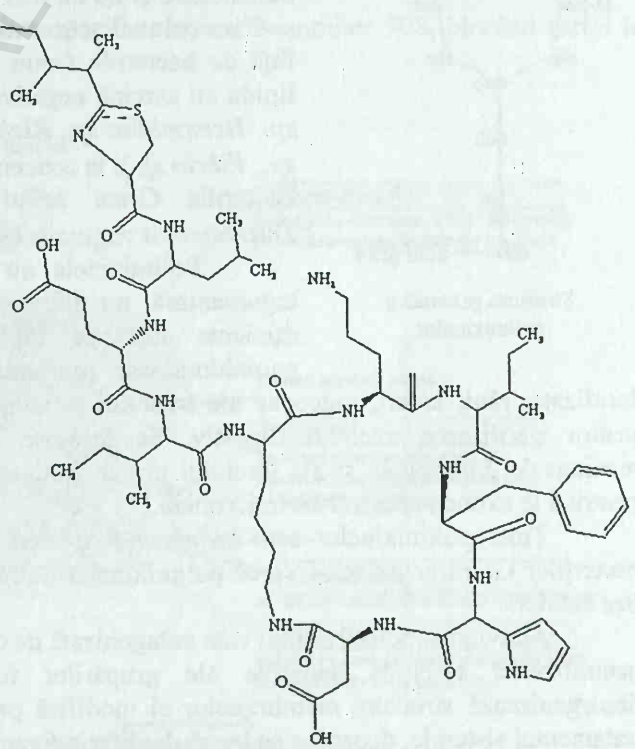
Cicloserina inhibă competitiv formarea D-ala din L-ala şi astfel stopează sinteza dipeptidului D-ala-D-ala. Este relativ toxică şi se foloseşte pentru tratamentul infecţiilor cu *M. tuberculosis*, rezistent la alte medicamente.

Fosfomicina este un inhibitor al piruvil-transferazei şi astfel blochează sinteza acidului N-acetil-muramic.

Cicloserina şi fosfomicina se comportă ca analogi ai precursorilor peptidoglicanului. Sunt molecule foarte hidrofile şi pătrund în citoplasmă pe calea sistemelor de transport pentru metaboliţii înrudiţi: *fosfomicina* este anologă structural cu *fosfo-enol-piruvatul*, iar *cicloserina* este analogă D-alaninei:

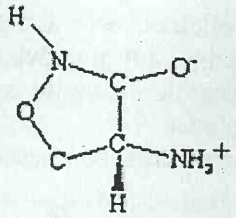


Structura moleculară a fosfo-enol-piruvatului

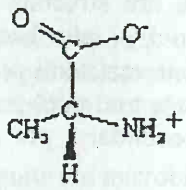


Structura bacitracinei

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Structura moleculară a D-Cicloserinei



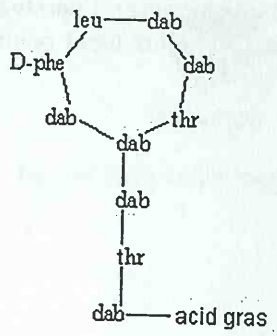
Structura moleculară a D-Alaninei

Inhibiția funcției membranei citoplasmatice. Membrana citoplasmatică acționează ca barieră de permeabilitate selectivă pentru ioni, nutrienți, este sediul structural al sistemelor de transport și controlează compoziția chimică a citoplasmei. Perturbarea integrității structurale și/sau funcționale atrage după sine modificarea permeabilității selective și pierderea echilibrului ionic sau macromoleculelor.

Bacteriile și fungii au membrană diferită de aceea a celulei animale, fiind mai ușor lezată de diferiți agenți terapeutici, ceea ce face posibilă terapia selectivă. Membranele biologice sunt alcătuite dintr-o matrice lipidică, în care sunt distribuite aleatoriu, proteinele globulare ce penetrează stratul lipidic. Agenții antimicrobieni pot să dezorganizeze membranele: pot fi cationici, anionici sau neutri. Efectul polimixinelor este asemănător cu al detergenților cationici. Molecula lor conține grupări hidrofile și hidrofobe. La pH neutru sunt încărcate pozitiv și pot fi considerate ca niște compuși cationici, cu activitate față de membrana externă polianionică a bacteriilor Gram negative, sarcină conferită de lipopolizaharide. Detergenții, molecule care conțin grupări lipofile și hidrofile, dezorganizează dublul strat lipidic și celula se sparge.

Polimixinele sunt antibiotice *polipeptidice* (octapeptide cu greutate moleculară mare), cu caracteristici chimice și proprietăți biologice identice. Sunt recunoscute 5 polimixine majore, distincte chimic, desemnate polimixina A, B, C, D, E.

dab = acid 1-diaminobutiric



Structura generală a polimixinelor

Cele mai reprezentative sunt *polimixina B* și *polimixina E* sau *colistina*. Toate sunt sintetizate de *Bacillus polymyxa* și au același spectru antibacterian. Sunt active în concentrații asemănătoare, dar produc efecte secundare semnificative. Polimixinele A și D sunt nefrotoxice și nu au fost niciodată folosite în clinică, iar polimixinele B și E au cel mai scăzut nivel de toxicitate. Aceste antibiotice sunt active față de bacteriile Gram negative, deoarece membrana externă conține lipide cu sarcină negativă (*Acinetobacter sp., Brucella sp., Escherichia sp., Hemophilus sp., Klebsiella sp., Yersinia sp., Salmonella sp., Shigella sp., Vibrio sp.*), la concentrații de până la 5 μg/ml. Nu sunt active față de bacteriile Gram pozitive, cocii Gram negativi și micobacterii. *Trichomonas vaginalis* este sensibil la concentrația de 125–250 μg/ml.

Polimixinele nu sunt absorbite după administrare orală sau tegumentară, nu difuzează semnificativ în țesuturi. De aceea nu sunt eficiente față de infecțiile sistemice difuze sau ale organelor parenhimatoase profunde, dar se folosesc în tratamentul infecțiilor localizate: răni, arsuri, mucoase ale tractului intestinal, cavitatea pleurală, spațiul dural, grefe sau pentru sterilizarea tractului digestiv. Se folosesc cu mare eficiență în tratamentul infecțiilor meningeale, pulmonare și ale tractului urinar. Polimixinele se asociază frecvent cu alte antibiotice, pentru a le extinde spectrul antimicrobian.

Ținta polimixinelor este *membrana lipidică*, adică membrana externă și citoplasmatică a bacteriilor Gram negative. Fixarea polimixinelor de membrane duce la dezorganizarea acestora și la liza celulei.

Activitatea polimixinelor este antagonizată de compușii anionici, de Mg^{2+} și de Ca^{2+}, deoarece neutralizează sarcinile negative ale grupărilor fosfat din membrana lipidică. Polimixinele dezorganizează structura membranelor și modifică profund permeabilitatea. Nu se folosesc pentru tratamentul sistemic, deoarece se leagă de diferiți liganzi tisulari și sunt toxice pentru rinichi și pentru sistemul nervos.

Fixarea antibioticelor în structura membranei depinde de concentrația cationilor bivalenți din mediu: carența sau excesul acestora inhibă acțiunea polimixinelor. Compoziția în LPS, fosfolipide și proteine a membranelor bacteriene influențează de asemenea fixarea și gradul de sensibilitate sau de rezistență al diferitelor specii bacteriene la acțiunea polimixinelor. Polimixina și alte molecule policationice se leagă de lipidul A al LPS, într-un raport stoichiometric și se inseră în structura membranei. Un astfel de mozaic molecular dezorganizează straturile lipidice, iar membrana nu mai funcționează normal ca barieră osmotică eficientă. Datorită alterărilor structurale ale membranei externe și interne, echilibrul osmotic este perturbat prin pierderea ionilor de K^+. Modificările permeabilității sunt asociate cu pierderea constituenților celulari solubili și a viabilității. Mecanismul este același cu cel propus pentru hemoliză sub acțiunea detergenților ionici. Efectul hemolitic se datorează dezorganizării complexului colesterol-fosfolipide-lipoproteine din membrana eritrocitului.

Concentrațiile minime inhibitorii ale polimixinelor opresc temporar creșterea bacteriilor sensibile, iar concentrațiile de 2–4 ori mai mari au efect bactericid rapid. Sensibilitatea nu depinde de faza de creștere a celulelor bacteriene. Bacteriile sensibile leagă cu afinitate înaltă polimixinele. Specificitatea înaltă a legării stă la originea unei metode eficiente pentru îndepărtarea endotoxinei din plasma pacienților septici, care este perfuzată printr-o coloană la care este legată polimixina.

Rezistența se datorează incapacității antibioticului de a penetra membrana externă.

O altă clasă de agenți terapeutici cu acțiune asupra membranei sunt *ionoforii*, compuși care permit difuzia rapidă a cationilor specifici prin membrană: valinomicina mediază trecerea specifică a ionilor de K și omoară celula prin perturbarea echilibrului electric, esențial pentru fosforilarea oxidativă. Ionoforii nu au acțiune selectivă asupra celulei bacteriene.

Daptomicina este un antibiotic lipopeptidic, bactericid prin legarea de membrana citoplasmatică, dependentă de Ca^{2+}. Efectul este depolarizarea membranei și eliberarea K^+ intracelular. Se folosește pentru tratamentul infecțiilor tegumentare și tisulare produse de bacteriile Gram pozitive rezistente la ß-lactami și vancomicină.

Alți agenți ce acționează asupra membranei citoplasmatice sunt amfotericina B, colistinul, imidazolii și triazolii.

Inhibiția sintezei proteinelor

O serie de clase de antibiotice acționează specific asupra ribosomilor 70S, blocând astfel la diferite niveluri sinteza proteică (fig. 366).

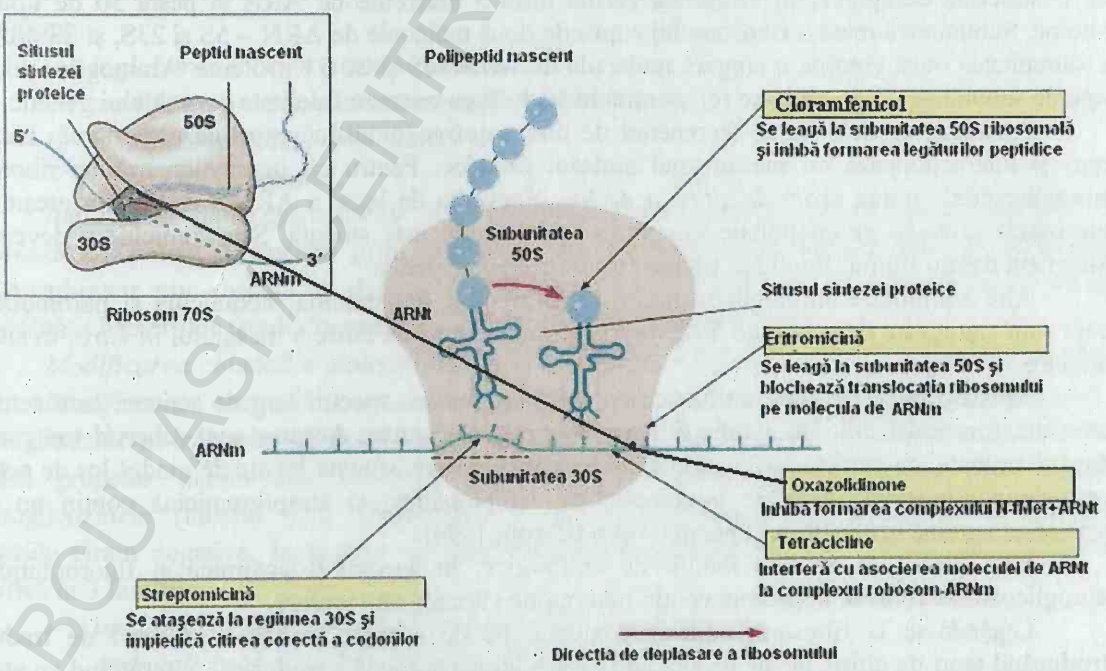
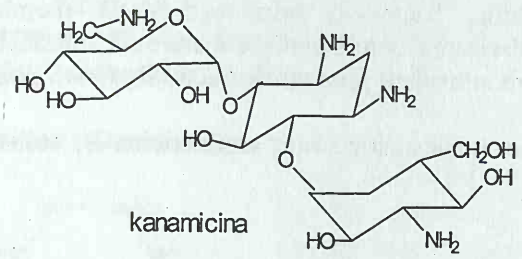


Fig. 366. Situsuri de acțiune ale diferitelor clase de antibiotice inhibitoare ale sintezei proteice (http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm).

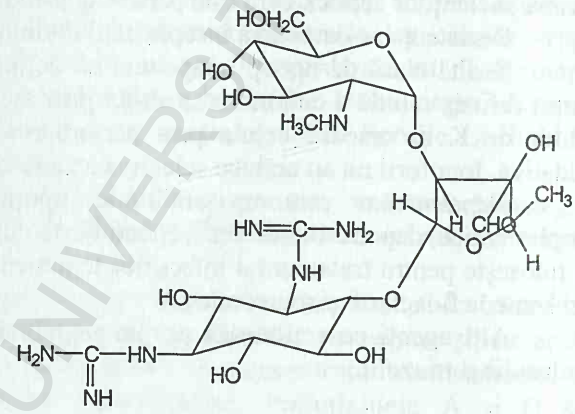
BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ

Aminoglicozidele sunt molecule *cationice* cu greutate moleculară mică, dar foarte *hidrofile*, care se acumulează în celulă numai printr-un proces de *transport dependent de energie*. Acumularea lor în celula bacteriană parcurge două faze: faza I este lentă şi depinde de gradientul transmembranar al potenţialului electric şi deci de sinergonul respirator oxidativ; faza a II-a este rapidă şi se traduce printr-o acumulare intracelulară importantă. Concentraţiile intracelulare sunt de circa 100 ori mai ridicate decât cele din mediul extern. Acumularea lentă a antibioticului determină un efect *bacteriostatic*, iar acumularea rapidă produce efectul *bactericid*. Rata acumulării este condiţionată de mărimea componentei electrice ($\Delta\psi$), a forţei proton-motrice care la rândul ei depinde de funcţionarea *catenei de respiraţie* şi de ATP-aza membranară. Astfel se explică de ce microorganismele cu sisteme transportoare deficiente, cum sunt cele anaerobe, sunt intrinsec rezistente la aminoglicozide. Din acelaşi motiv, enterococii şi alţi anaerobi facultativi sunt rezistenţi la concentraţiile mici de aminoglicozide.

Un rol important în acumularea intracelulară a aminoglicozidelor îl au proteinele periplasmatice a căror sinteză este indusă de antibiotic.



kanamicina



streptomicina

Aminoglicozidele se leagă de *ribosomii bacterieni* şi inhibă sinteza proteinelor. Ribosomul este o structură complexă, în alcătuirea căruia intră 3 molecule de ARN şi peste 50 de tipuri de proteine. Subunitatea mare a ribosomului cuprinde două molecule de ARN – 5S şi 23S, şi 33 proteine, iar subunitatea mică conţine o singură moleculă de ARN 16S şi 20-21 proteine. Aminoglicozidele se leagă de subunitatea 30S, care are rol esenţial în traducerea cu mare fidelitate a mesajului genetic.

Aminoglicozidele induc fenomenul de *pleiotropism* (modifică expresia unui număr mare de gene) şi interacţionează cu mecanismul sintezei proteice. Pentru că interacţionează cu ribosomii, aminoglicozidele induc *erori de citire a ARNm.* Secvenţa de baze a ARNm este citită greşit şi se sintetizează proteine nefuncţionale sau sinteza proteinelor este stopată. Streptomicina a devenit un instrument pentru studiul fidelităţii traducerii informaţiei genetice.

Alte antibiotice aminoglicozidice (bluensomicina, kanamicina, neomicina şi paromomicina (toate sunt sintetizate de specii de *Streptomyces*), induc erori de citire a mesajului *in vitro*, în sisteme acelulare.

Aminoglicozidele sunt antibiotice cu efect rapid şi cu spectru larg de acţiune: sunt sensibile bacteriile strict sau facultativ aerobe Gram pozitive sau negative. Acestea sunt zaharuri sau pseudo-zaharuri aminate, cu caracter policationic, care explică câteva aspecte legate de modul lor de acţiune. Toate aminoglicozidele utilizate în terapeutică, streptomicina şi streptinomicina conţin un ciclu deoxistreptomicină bisubstituit în poziţia 4 şi 6 (Caron, 1994).

Spre deosebire de alte familii de antibiotice, în special β-lactamice şi fluoroquinolone, aminoglicozidele folosite în prezent conţin mai puţine variante moleculare.

Legându-se la ribosom, aminoglicozidele, pe de o parte perturbă procesul de traducere introducând erori de citire, iar pe de alta antrenează stoparea totală a traducerii, interferând cu etapele

de iniţiere, alungire şi terminare. Efectul primar al aminoglicozidelor ar fi *ocuparea situsului acceptor* (A) *al ribosomului.*

Streptomicina este un glicozid aminociclitol, larg folosit în terapia tuberculozei. La micobacterii, streptomicina inhibă sinteza proteinelor după 5–15 minute, iar sinteza acizilor nucleici continuă pentru o lungă perioadă de timp. Deoarece inhibă sinteza proteinelor, efectul aminoglicozidelor este *bactericid.* Streptomicina se leagă de proteina S12 din subunitatea 30S şi face ca ribosomul să citească greşit codul genetic. Alte aminoglicozide se leagă nu numai de proteina S12, ci şi de proteina L6 a subunităţii 50S. Acest ultim situs de legare este important pentru rezistenţa bacteriilor la aminoglicozide. Componenta chimică ce determină citirea greşită este streptamina sau deoxistreptamina, din moleculele de streptomicină, kanamicină, neomicină, paroromicină, gentamicină, bluensomicină etc.

Spectinomicina este un antibiotic aminociclitol, înrudit cu aminoglicozidele şi care are acţiune bacteriostatică. Acţiunea sa antibacteriană constă în legarea cu o altă proteină ribosomală. Este astfel blocată interacţiunea ARNm-ribosom, fără să producă citirea greşită. Se foloseşte pentru tratamentul gonoreii (*N. gonorrhoeae*) rezistente la penicilină. În scopul tratamentului infecţiilor intracelulare, aminoglicozidele au fost încapsulate în liposomi. Încapsularea în liposomi poate să crească indexul terapeutic al medicamentului prin diminuarea nivelului medicamentului eliberat la situsurile unde este toxic faţă de nivelul eficienţei terapeutice.

Aminoglicozidele sunt eliminate prin filtrare glomerulară şi sunt parţial reabsorbite de celulele tubulare proximale printr-un mecanism de pinocitoză în vezicule mici, care fuzionează cu lizosomii, unde se acumulează. Ele induc o fosfolipidoză lizosomală caracterizată prin inhibiţia activităţii sfingomielinazei şi fosfolipazei A_1 şi prin acumularea fosfolipidelor în lizosomi. Fosfolipidoza este însoţită de necroză celulară şi regenerare postnecrotică.

Diferiţi compuşi sau medicamente administrate concomitent cu aminoglicozidele pot să mărească nivelul toxicităţii (vancomicina, cisplatinul şi hidrocortizonul) sau pot să-l diminueze (ticarcilina, carbenicilina, cefalotina, acidul poli-L-aspartic). Toxicitatea aminoglicozidelor nu este influenţată de modul de administrare (singure sau în asociaţie), dar unele medicamente diminuează nivelul renal al acumulării în celulele tubulare.

Rezistenţa la antibioticele aminoglicozidice este larg răspândită şi se produce prin următoarele mecanisme:

- *înglobarea scăzută a antibioticului;*
- *modificarea enzimatică a aminoglicozidelor;*
- *modificarea ţintei ribosomale;*
- *efluxul antibioticului;*

Înglobarea aminoglicozidelor necesită funcţionarea catenei de respiraţie celulară, care generează un potenţial electric prin membrana citoplasmatică. Un nivel scăzut al potenţialului transmembranar sau absenţa sa determină rezistenţa intrinsecă a bacteriilor anaerobe şi scăderea sensibilităţii bacteriilor facultativ anaerobe (enterococi) la aminoglicozide.

Modificarea chimică a aminoglicozidelor este principalul mecanism de rezistenţă bacteriană.

Modificarea enzimatică a aminoglicozidelor este mecanismul major de rezistenţă la aminoglicozide al izolatelor clinice Gram pozitive şi Gram negative. Modificarea chimică are loc la nivelul grupelor *amino* sau *hidroxil.* S-au identificat peste 50 de enzime care modifică aminoglicozidele (tabelul 65). Majoritatea genelor codificatoare ale enzimelor se găsesc la bacteriile Gram negative. În funcţie de tipul modificării chimice pe care o catalizează, acestea se clasifică în 3 familii:

- *aminoglicozid-acetil-transferaze* (AAC);
- *aminoglicozid-adenilil-transferaze* (ANT);
- *aminoglicozid-fosfotransferaze* (APH).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 65.

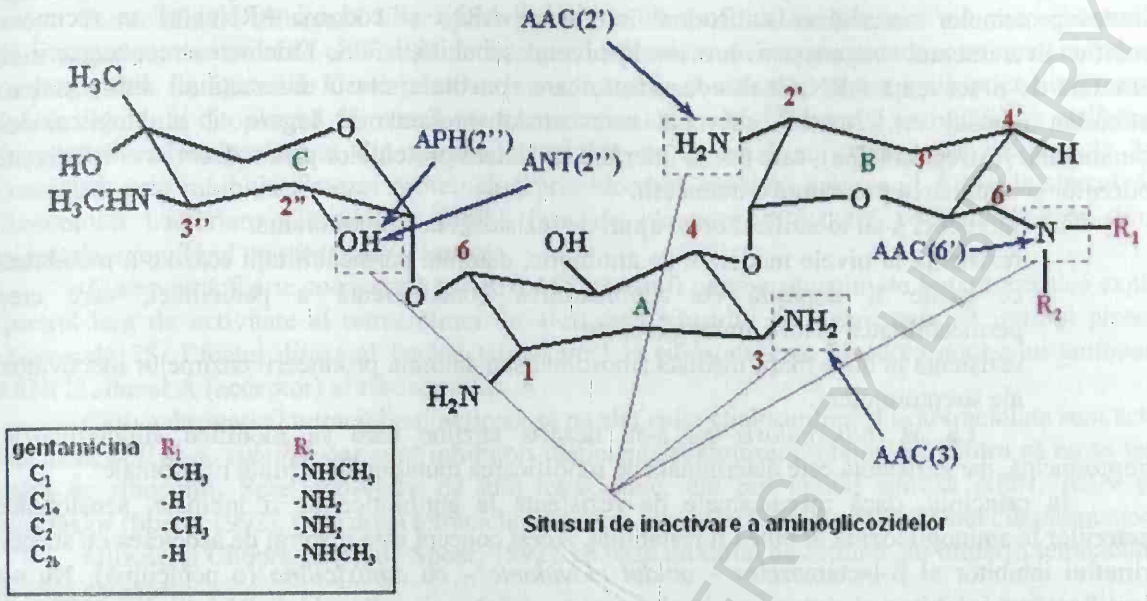
Determinismul genetic al mecanismelor de rezistenţă enzimatică la aminoglicozide şi distribuţia acestora la diferite genuri şi specii bacteriene (după Shaw şi colab., 1993)

Enzima	Gene	Substratul enzimatic	Comentarii
Acetilare			
AAC(3)-I	*aac(3)-Ia* *aac(3)-Ib*	Gm	
AAC(3)-II	*aac(3)-IIa* *aac(3)-IIb* *aac(3)-IIc*	Gm, Tob	
AAC(3)-III	*aac(3)-IIIa* *aac(3)-IIIb* *aac(3)-IIIc*	Gm, Tob, Km, Neo, Prm	*Pseudomonas spp.* Rar întâlnite la *Enterobacteriaceae*
AAC(3)-IV	*aac(3)-IVa*	Gm, Tob	*Salmonella spp.*
AAC(3)-VI	*aac(3)-VIa*	Gm	Nu conferă rezistenţă la Tob şi Km. Rar întâlnite la *Enterobacteriaceae*
AAC(6')-I	*aac(6')-Ia* *aac(6')-Ib* *aac(6')-Ic* *aac(6')-Id* *aac(6')-Ie* *aac(6')-If* *aac(6')-Ig* *aac(6')-Ih* *aac(6')-Ii*	Tob, Amk	
AAC(6')-II	*aac(6')-IIa* *aac(6')-IIb*	Gm, Tob	Numai la *Ps. aeruginosa*
AAC(6')-APH(2")	*aac(6')-aph(2")*	Gm, Tob, Amk	Enzimă bifuncţională la stafilococci şi enterococci
AAC(2')-I	*aac(2')-Ia*	Gm, Tob	
Adenilare			
ANT(2")-I	*ant(2")-Ia* *ant(2")-Ib* *ant(2")-Ic*	Gm, Tob, Km	Larg răspândite la bacteriile Gram negative
ANT(3")-I	*ant(3")-Ia*	Sm, Spcm	
ANT(4')-I	*ant(4')-Ia*	Tob, Amk	
ANT(4')-II	*ant(4')-IIa*	Tob, Amk	
ANT(6)-I	*ant(6)-Ia*	Sm	Larg răspândite la bacteriile Gram pozitive
Fosforilare			
APH(2")-I	*aph(2")-Ia*	Gm, Tob, Amk	
APH(3')-I	*aph(3')-Ia* *aph(3')-Ib* *aph(3')-Ic*	Km, Neo, Prm	
APH(3')-II	*aph(3')-IIa*	Km, Neo, Prm, GmB	
APH(3')-III	*aph(3')-IIIa*	Km, Neo, Prm, Amk, GmB	*S. aureus* *E. faecalis*
APH(3')-IV	*aph(3')-IVa*	Km, Neo, Prm	
APH(3')-V	*aph(3')-Va* *aph(3')-Vb* *aph(3')-Vc*	Neo, Prm	
APH(3')-VI	*aph(3')-VIa* *aph(3')-VIb*	Km, Neo, Prm, Amk, GmB	*Acinetobacter spp.*
APH(3')-VII	*aph(3')VIIa*	Km, Neo	*Campylobacter jejuni*
APH(3")-I	*aph(3")-Ia* *aph(3")-Ib*	Sm	*Streptomyces griseus*
APH(6)-I	*aph(6)-Ia* *aph(6)-Ib* *aph(6)-Ic* *aph(6)-Id*	Sm	*Streptomyces spp.*

Abrevieri: Amk, amikacină; Gm, gentamicină, GmB, gentamicină B; Km, kanamicină; Neo, neomicină; Pm, paromicină; Spcm, spectinomicină; Sm, streptomicină; Tob, tobramicină.

Aminoglicozid O-fosfo-transferaza (APH) şi *aminoglicozid O-adenil* sau *nucleotidil-transferaza* (AAD sau ANT), catalizează *fosforilarea* şi respectiv *nucleotidilarea grupării hidroxil*, iar *aminoglicozid-N-acetiltransferaza* (AAC) catalizează acetilarea grupărilor *amino*. APH şi ANT folosesc ATP şi ACA (acetil-coenzima A).

Fiecare dintre aceste familii de enzime este împărţită în clase, desemnate prin situsul pe care-l modifică (fig. 367).



gentamicina	R_1	R_2
C_1	$-CH_3$	$-NHCH_3$
C_{1a}	-H	$-NH_2$
C_2	$-CH_3$	$-NH_2$
C_{2b}	-H	$-NHCH_3$

Fig. 367. Situsurile moleculei de gentamicină la nivelul cărora acţionează diferite enzime inactivatoare (Mingeot-Leclercq şi colab, 1999).

Aminoglicozid-fosfotransferazele – APH – (7 clase) sunt kinaze, utilizează ATP ca substrat secundar şi fosforilează grupările specifice OH, la toate clasele de antibiotice aminoglicozidice.

Aminoglicozid-acetiltransferazele – AAC – (4 clase de enzime) utilizează acetil-CoA ca donor al grupării acetil pentru modificarea aminoglicozidelor la gruparea *amino* din poziţiile 1 şi 3 ale inelului deoxistreptaminei şi la poziţiile 2' şi 6' ale inelului 6-aminohexozei. Aminoglicozid 6'-acetiltransferazele au spectru larg şi pot modifica majoritatea aminoglicozidelor cu importanţă clinică.

Aminoglicozid-nucleotidiltransferazele – ANT – (5 clase) utilizează ATP ca substrat secundar şi modifică antibioticele aminoglicozidice prin transferul AMP la gruparea OH la poziţiile 2'', 3'', 4' şi respectiv 9.

Aminoglicozidele modificate la grupările *amino* sau la grupul *OH* sub acţiunea celor trei categorii de enzime, se leagă slab sau pierd total capacitatea de a se lega de ribosomi şi nu declanşează faza a II-a a înglobării – dependentă de energie.

Efectul inhibitor asupra sintezei proteinelor celulare nu se mai produce şi bacteriile supravieţuiesc în prezenţa medicamentului. Inactivarea enzimatică a aminoglicozidelor este mecanismul principal de rezistenţă a stafilococilor. Din punct de vedere biochimic, acest mecanism de rezistenţă este de departe cel mai important, fiind implicat în totalitatea cazurilor de rezistenţă observate la enterobacterii (> 95%), la *Acynetobacter* (95%) şi la bacteriile Gram pozitive şi jumătate din cazurile de rezistenţă observate la *Pseudomonas*.

Mecanismele neenzimatice de rezistenţă la antibioticele aminoglicozidice sunt:

- *sistemele de eflux;*
- *mutaţiile ARNr.*

Rezistenţa datorată modificării ţintei macromoleculare este o modalitate majoră de dezvoltare a rezistenţei. Modificările ţintei care determină rezistenţa la aminoglicozide includ schimbările mutaţionale ale proteinelor ribosomale sau ale ARN 16S şi metilarea enzimatică a ARNr. Schimbările mutaţionale produc rezistenţa în special la streptomicină. Studiile de RMN (rezonanţă magnetică nucleară) asupra nucleotidelor ce cuprind situsul A (acceptor) al ARN 16S, complexat cu paromomicina, precum şi asupra subunităţii 30S complexată cu acelaşi antibiotic, relevă că medicamentul se leagă în depresiunea majoră a situsului A. Metilarea N_7 a resturilor de guanină ale

SUCEAVA UNIVERSITY LIBRARY

ARN 16S produce rezistența la concentrații mari de aminoglicozide la microorganismele producătoare de aminoglicozide, dar acest tip de rezistență n-a fost raportat la bacteriile cu importanță clinică. Sinteza proteinelor necesită ca anticodonii aminoacil-ARNt și codonii ARNm să se recunoască specific. Evenimentul recunoașterii are loc la nivelul subunității 30S. Fidelitatea recunoașterii este garantată de o secvență ARNr înalt conservată, care constituie situsul interacțiunii dintre codon și anticodon (situsul A). Această secvență este situsul preferat de legare al aminoglicozidelor (kanamicina și streptomicina), care pot să interfere cu sinteza proteinelor prin inducerea citirii greșite a codonilor și terminarea prematură a traducerii.

La enterococi s-au identificat două tipuri de rezistență la streptomicină:

- rezistența la nivele moderate de antibiotic, datorată permeabilității scăzute a membranei, ce poate fi depășită cu administrarea concomitentă a penicilinei, care crește permeabilitatea pentru aminoglicozide;
- rezistența la doze mari, mediată ribosomal sau datorată producerii enzimelor inactivatoare ale streptomicinei.

La *M. tuberculosis* nu s-au descris enzime care să modifice aminoglicozidul streptomicină, dar rezistența este determinată de modificarea mutațională a țintei ribosomale.

În principiu, dacă mecanismele de rezistență la antibiotice ar fi inhibate, sensibilitatea bacteriilor la aminoglicozide ar putea fi restabilită. Acest concept este inspirat de asocierea cu succes a primului inhibitor al β-lactamazelor – *acidul clavulanic* – cu *amoxicilina* (o penicilină). Nu s-au identificat însă inhibitori ai sintezei enzimelor care modifică aminoglicozidele (Vakulenko, 2003).

Streptomicina produce efecte secundare: este afectat nervul acustic și apar deficiențe de auz, care pot dispărea după întreruperea tratamentului sau pot să persiste.

Toxicitatea aminoglicozidelor se datorează faptului că sunt cationi polari, filtrați de glomerulul renal și excretați nemodificați în urină. În tubii renali, aminoglicozidele sunt reabsorbite prin legarea de fosfolipidele membranare anionice, urmate de endocitoză și sechestrare în lizosomi. Se crede că la o anumită concentrație prag, lizosomii se rup, eliberează enzimele hidrolitice și produc necroza tisulară.

Tetraciclinele formează o familie de antibiotice *inhibitoare ale sintezei proteinelor* prin mecanismul blocării atașării complexului aminoacil-ARNt la situsul acceptor al ribosomului (situsul A). Efectul bacteriostatic al acestor antibiotice are un spectru larg de acțiune, fiind active față de bacterii Gram pozitive și Gram negative, față de chlamidii, micoplasme, ricketsii și protozoare.

Tetraciclinele sunt agenți chelatori puternici, proprietățile lor farmacologice sunt influențate de prezența ionilor metalici. Fiecare dintre inelele nucleului linear tetraciclic trebuie să conțină numai atomi de C, pentru ca antibioticul să-și păstreze activitatea. Excepția este *6-tiotetraciclina*, care deși posedă un atom de S la poziția 6 a inelului C, are acțiune antibacteriană.

Tetraciclinele atipice (tiotetraciclina și alți analogi ai tetraciclinelor) perturbă *structura membranei* citoplasmatice și efectul este *bactericid*, ceea ce contrastează cu efectul bacteriostatic reversibil al tetraciclinelor inhibitoare ale sintezei proteinelor. Efectul atipic de dezorganizare a membranei este probabil consecința caracterului lipofil al moleculei, rezultată din planaritatea inelelor B, C și D. Tetraciclinele atipice sunt probabil încorporate în mediul hidrofob al membranei. Din cauza efectelor secundare, derivate din interacțiunea lor nespecifică cu membranele celulelor procariote și eucariote, tetraciclinele atipice nu prezintă interes terapeutic.

În mod obișnuit, se utilizează *tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina*, dar și cele noi, de semisinteză: *minociclina* și *doxiciclina*. Toate sunt bacteriostatice, se absorb ușor din tubul digestiv și se distribuie larg în țesuturi și fluide, cu excepția lichidului cefalorahidian.

Tetraciclinele au un *spectru foarte larg* de acțiune: sunt active față de multe bacterii Gram pozitive și Gram negative, față de rickettsii, chlamidii, micoplasme și față de unii fungi, dar distrug și microbiota normală a intestinului și produc tulburări gastro-intestinale. Tetraciclinele pot produce efecte toxice asupra țesutului hepatic și renal. Tetraciclina administrată în timpul sarcinii poate duce la deformarea oaselor cutiei craniene a fătului. Administrarea în timpul sarcinii sau în primii 5 ani de

viață are ca rezultat colorarea dinților, atât deciduali, cât și permanenți, doarece mugurii ambelor dentiții se formează înainte de naștere. Efectele tetraciclinelor asupra dinților și oaselor se datorează capacității lor de a lega ioni de Ca^{2+}.

Tetraciclinele difuzează liber (pasiv) prin porii hidrofili ai membranei externe a bacteriilor Gram negative, dar necesită un sistem de transport dependent de energie pentru a traversa membrana citoplasmatică. La bacteriile Gram pozitive (nu au membrană externă), aceste antibiotice nu difuzează liber în celulă. În citoplasmă formează complexe cationice cu Mg^{2+}, datorită activității lor chelatoare. Complexul molecular format din tetraciclină și Mg se asociază cu subunitatea ribosomală 30S. Consecința este inhibiția sintezei proteinelor, prin blocarea asocierii aminoacil-ARNt la situsul A al ribosomului bacterian. Tetraciclina inhibă faza de *elongare a catenei polipeptidice* în timpul traducerii, exercitând un efect *bacteriostatic*.

O secvență foarte conservată a ARNr 16S pare a fi parte a situsului de legare, ceea ce explică spectrul larg de activitate al tetraciclinei. În alcătuirea situsului de legare pare să intre și proteina ribosomală 7S. Efectul direct al legării tetraciclinei la ribosomi este blocarea accesului aminoacil-ARNt la situsul A (acceptor) al ribosomului.

Câțiva derivați ai tetraciclinei acționează pe altă cale: chelocardina și tiotetraciclina sunt active față de *E. coli* și *B. subtilis*, dar sunt inhibitori ineficienți ai sintezei proteinelor, pentru că nu se leagă stabil de ribosomi. Spre deosebire de alte tetracicline, ele pot inhiba sinteza ADN, ARN și a proteinelor (Speer, 1992). Cele două tetracicline ar putea avea efecte asupra membranei citoplasmatice.

Olivera și Chopra (citați de Speer, 1992), pe baza modului de acțiune, au împărțit tetraciclinele în două categorii:

- cele care *inhibă sinteza proteinelor* (teraciclina, clortetraciclina, minociclina);
- cele care interacționează cu *membrana citoplasmatică* (chelocardina, tiotetraciclina, anhidrotetraciclina).

Legarea tetraciclinelor cu proteinele ribosomului este tranzitorie, ceea ce explică efectul *bacteriostatic* al acestor antibiotice. Sunt inhibitoare față de o varietate largă de bacterii Gram pozitive și Gram negative, chlamidii și micoplasme. Celulele mamiferelor nu concentrează tetraciclina (așa cum fac bacteriile) și de aceea ribosomii lor sunt rezistenți, cu posibila excepție a ribosomilor 70S mitocondriali. Se administrează oral, dar formează complexe neabsorbabile cu ionii bivalenți. Tetraciclina și derivații săi au o utilizare clinică limitată, datorită frecvenței crescute a tulpinilor rezistente. De exemplu, în anii '80, tetraciclina era folosită pentru tratamentul infecțiilor cu transmitere sexuală, dar după apariția tulpinilor rezistente de *N. gonorrhoeae*, n-a mai fost utilizată ca antibiotic de primă importanță terapeutică. Oxitetraciclina și tetraciclina sunt încă folosite în tratamentul uretritei nongonococice și a infecțiilor chlamidiale.

Rezistența la tetraciclină este larg răspândită la cocii Gram pozitivi și se manifestă și la *Mycoplasma*. De aceea, tetraciclina nu se folosește pentru tratamentul primar al infecțiilor tractului respirator inferior. Deși acțiunea sa principală este antibacteriană, tetraciclina este activă față de protozoarele parazite: inhibă *Giardia lamblia, Trichomonas vaginalis, Entamoeba histolytica, Plasmodium falciparum*. Eficiența derivaților tetraciclinei față de protozoarele parazite este corelată cu gradul de pătrundere în celulă. Cei mai eficienți sunt derivații lipofili, care străbat repede membrana citoplasmatică (tiotetraciclina).

Numeroase specii bacteriene au dobândit *rezistență* la acțiunea bacteriostatică a tetraciclinelor. S-au identificat cel puțin 24 de *gene codificatoare ale rezistenței* la tetraciclină și 3 determinanți de rezistență la oxitetraciclină, mai întâi la *Streptomyces*, care produce oxitetraciclina și la *Mycobacterium* sp.

Rezistența determinată genetic (Taylor, 1996) este mediată prin mecanisme diferite:

- *protecția ribosomilor* prin intermediul proteinelor solubile;
- *pompe de eflux*, dependente de energie, care elimină tetraciclina din celulă;
- *impermeabilitatea*;
- *inactivarea enzimatică* (degradarea oxidativă) a antibioticelor.

Mecanismul de acțiune a proteinelor de protecție ribosomală. Protecția ribosomală este rezultatul sintezei unor proteine codificate de genele de rezistență, care se asociază cu ribosomii și interferă cu legarea tetraciclinei. Tetraciclinele inhibă sinteza proteinelor prin legarea cu afinitate

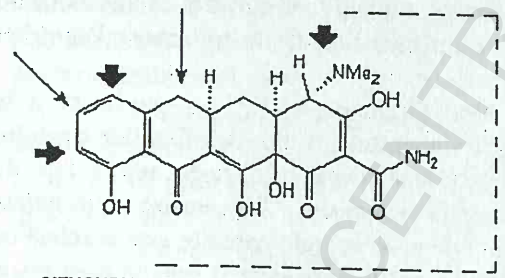
înaltă, de un singur situs localizat pe subunitatea ribosomală 30S, probabil de proteinele S_7, S_{14} şi S_{19}. Legarea tetraciclinei în acest situs blochează legarea aminoacil-ARNt sintetazei la situsul ribosomal A (acceptor). Treapta sintezei proteice inhibată de tetraciclină este cea catalizată de EF-Tu (*e*longation *f*actor *t*hermo-*u*nstable).

Activitatea *pompelor de eflux* este o modalitate de a limita accesul tetraciclinei la ribosomi şi are ca rezultat creşterea capacităţii celulei de a elimina antibioticul la o rată egală cu rata înglobării. Este cel mai comun mecanism de rezistenţă, mediat de produsele de sinteză ale genelor de rezistenţă: acestea sunt proteine ale membranei citoplasmatice care funcţionează ca transportori ai tetraciclinei, dependenţi de energie. Deşi efluxul împiedică acumularea tetraciclinei chiar în celulele rezistente, nivelul intracelular al antibioticului depăşeşte nivelul inhibitor al sintezei proteinelor (B. Speer, 1992). Explicaţia se bazează pe capacitatea tetraciclinei de a exista în mai multe forme ionice. Este posibil ca o anumită formă să se lege mai uşor de ribosomi, comparativ cu altele. La tulpinile rezistente este eliminată forma activă a antibioticului, iar în celulă rămâne o concentraţie mare de tetraciclină inactivă sau mai puţin activă, compatibilă cu sinteza proteinelor.

Impermeabilitatea structurilor de suprafaţă ale celulei constituie o cauză importantă a rezistenţei la tetracicline. Pentru a inhiba sinteza proteinelor, tetraciclinele trebuie să pătrundă în celula bacteriană şi să se lege de ribosomi. Tetraciclina poate exista în două forme: o formă protonată (TH_2) şi o formă legată de Mg^{2+} (THMg). Proporţia $THMg^{2+}$ creşte la pH mai mare. Tetraciclina este acumulată în celulă ca $THMg^{2+}$, deoarece pH intern este mai mare decât cel extern. Forma protonată a tetraciclinei difuzează prin membrana citoplasmatică. Difuzia simplă nu explică faptul că bacteriile sensibile acumulează tetraciclină în citoplasmă. În afara difuziei, tetraciclina este înglobată printr-un mecanism dependent de energie, care nu implică o proteină de transport, ci diferenţa de pH între mediul celular şi extracelular. Alterarea porinelor, cu limitarea difuziei tetrciclinelor în spaţiul periplasmic, este un mecanism posibil de rezistenţă la bacteriile Gram negative.

Cele două mecanisme de rezistenţă la tetracicline (proteinele protectoare ale ribosomilor şi proteinele de eflux) nu inactivează antibioticul. Rareori, antibioticul este inactivat sau modificat pe cale chimică.

Inactivarea enzimatică a tetraciclinelor nu are semnificaţie ca mecanism de rezistenţă, dar s-a evidenţiat la *Bacteroides*. Câteva specii de *Bacteroides degradează oxidativ* molecula de antibiotic. Gena care codifică acest tip de rezistenţă este localizată pe 2 transpozoni înrudiţi, ce poartă de asemenea o genă de rezistenţă la eritromicină. Gena codificatoare a enzimei care degradează tetraciclina este inactivă la celulele de *E. coli* crescute în anaerobioză sau de *Bacteroides*.



SITUSURI DE INACTIVARE A MOLECULEI DE TETRACICLINĂ

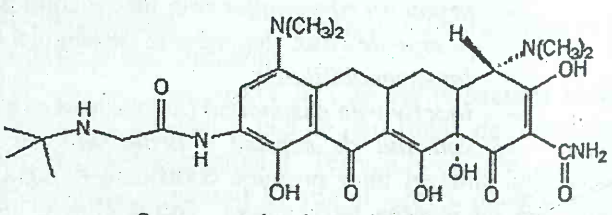
➡ Modificări majore

——➤ Modificări minore

– – – Aria critică de acţiune a enzimelor degradative

Gliciltetraciclinele sunt reprezentate de *tigeciclină,* utilizată pentru tratamentul infecţiilor cutanate şi intraabdominale. Caracteristica structurală a tigeciclinei constă în substituţia în poziţia 9 a tetraciclinei, cu un rest de glicină. Este un antibiotic cu spectru larg de acţiune faţă de bacterii Gram pozitive, Gram negative, aerobe şi anaerobe, dar şi faţă de bacterii patogene rezistente la alte antibiotice: enterococi rezistenţi la vancomicină, *S. aureus* meticilino-rezistent (MRSA), *Str. pneumoniae* rezistent la penicilină. Este activă faţă de patogenii Gram negativi: enterobacterii, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Legionella pneumophila*, micobacterii netuberculoase cu creştere rapidă.

Dactilociclinele sunt derivaţi ai tetraciclinei, produşi de *Dactylosporangium*. Ele diferă de alţi derivaţi prin aceea că sunt *tetracicline glicozidice*. Utilizarea clinică este limitată, deoarece par să fie active numai faţă de tulpinile bacteriene care poartă gene de rezistenţă la tetraciclina din clasa K. Unele



Structura moleculară a tigeciclinei

izolate bacteriene sensibile la tetraciclină nu sunt inhibate de dactilocicline. Incapacitatea lor de a inhiba bacteriile Gram pozitive şi Gram negative se datorează probabil impermeabilităţii structurilor de suprafaţă faţă de dactilocicline (Speer şi colab., 1992).

Tetraciclinele se administrează oral, dar unele sunt disponibile ca produse pentru administrare parenterală. După administrare orală, tetraciclinele sunt absorbite în stomac şi în intestinul subţire. Absorbţia este influenţată de conţinutul alimentar şi de cationii bivalenţi. Cu ionii de Ca^{2+}, tetraciclinele formează complexe neabsorbabile. Ele pătrund moderat în fluidele organismului şi în ţesuturi şi sunt excretate prin urină.

Tetraciclinele sunt antibiotice cu spectru larg, fiind utilizate în clinica umană pentru tratamentul infecţiilor cu bacterii Gram pozitive şi Gram negative. Sunt de asemenea active faţă de agentul malariei şi se folosesc pentru profilaxia tulpinilor de *Plasmodium falciparum* rezistente la agenţii chimioterapeutici specifici.

Macrolidele, Lincosamidele şi Streptograminele (MLS) au o structură chimică diferită, dar acţionează într-o manieră asemănătoare asupra unei game variate de bacterii (Gram pozitive, coci Gram negativi, *Chlamydia*, micoplasme, *Legionella*). Absenţa efectului asupra bacililor Gram negativi se explică prin incapacitatea de a difuza prin membrana externă, datorită caracterului hidrofob al moleculei acestora. Macrolidele şi lincosamidele au proprietăţi antibacteriene, cel mai adesea *bacteriostatice*.

Situsul acţiunii macrolidelor este subunitatea mare a ribosomilor bacterieni. MLS acţionează asupra ribosomilor şi împiedică ribosomul bacterian să traducă ARN în două moduri diferite.

a) *Macrolidele inhibă sinteza proteică dependentă de ARN, la treapta alungirii catenei, producând inhibiţia translocării peptidil-ARNt de la situsul acceptor(A), la situsul peptidil donor* (P). Ele se leagă de subunitatea ribosomală 50S şi interferă cu procesul de translocaţie a polipeptidului nascent, deoarece stimulează disocierea complexului peptidil-ARNt de ribosomi, în timpul sintezei. Centrul peptidil-transferazei (din subunitatea 50S) este situsul interacţiunii antibioticelor MLS, al cloramfenicolului şi puromicinei şi pare a fi format în întregime de structura secundară a ARN 23S din bucla centrală a domeniului V(din cele 6 domenii). Consecinţa este terminarea prematură a catenei şi oprirea reversibilă a sintezei proteinelor. Pentru eritromicină este suficientă legarea unei singure molecule cu subunitatea mare a ribosomului. Eritromicina interacţionează cu ARNr, la nivelul unei bucle a unor domenii îndepărtate în structura primară a ARN, dar care prin pliere sunt aduse în juxtapoziţie: domeniile II şi V ale ARNr 23S. Macrolidele se leagă probabil la situsul *peptidil donor* (P) al ribosomului şi prin competiţie interferă cu translocaţia peptidului de la situsul acceptor la situsul donor. Eritromicina poate să producă disocierea peptidil-ARNt de ribosom. La *E. coli*, eritromicina inhibă formarea subunităţii ribosomale 50S.

b) *Al doilea mecanism de acţiune constă în inhibarea treptelor iniţiale ale asamblării subunităţii ribosomale 50S.* Macrolidele şi ketolidele interacţionează cu subunitatea 50S parţial asamblată, blocând procesul asamblării. Componentele neasamblate sunt supuse degradării nucleolitice. În celulele tratate cu eritromicină se acumulează un precursor al subunităţii 50S. Eritromicina se leagă de subunitatea incompletă formată din ARNr 23S, 5S, dar conţine numai 18 dintre cele 34 proteine ribosomale ale subunităţii mari. Situsul de legare la subunitatea ribosomală 50S este comun pentru eritromicină, pentru macrolidele noi, pentru lincosamidă şi streptogramina B.

Denumirea de *macrolide* desemnează un grup de antibiotice înrudite structural, produse de specii ale genului *Streptomyces*.

Grupul macrolidelor cuprinde numai compuşi nepolienici (de exemplu, eritromicina). Compuşii care conţin un sistem format din mai mult de două legături duble de C conjugate, sunt clasificaţi ca *poliene*. Din punct de vedere *structural*, macrolidele sunt caracterizate printr-un *inel lactonic* multiunitar, cu puţine legături duble, fără atomi de N, la care se ataşează, prin legături glicozidice, 1–3 componente glucidice. Macrolidele pot fi glucide aminate sau glucide fără N (neutre). Sunt poliketide naturale, produse ale metabolismului secundar la multe specii ale g. *Streptomyces*.

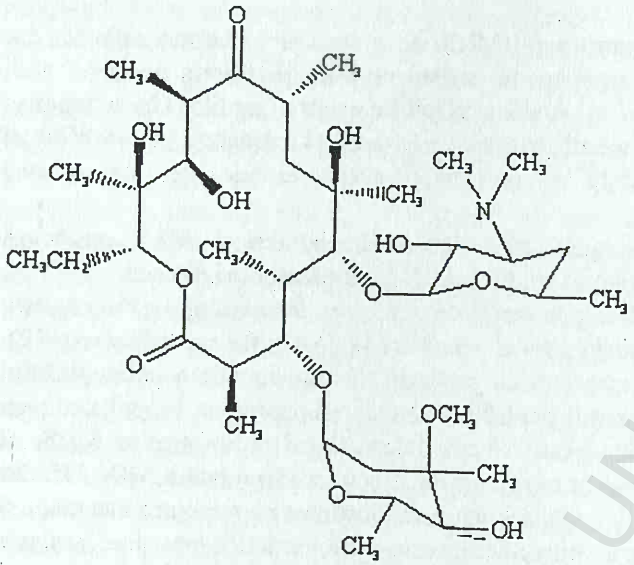
Macrolidele prezintă diferenţe structurale, dar posedă un schelet de C comun. După numărul de atomi de C ai inelului lactonic (de obicei par), se disting compuşi cu 12, 14, 15 sau 16, cu substituienţi variaţi (grupări metil, hidroxil). Prezenţa grupărilor determină asimetria centrilor inelului

lactonic. Componentele glucidice ataşate prin legături glicozidice de inelul lactonic sau legate una de alta, sunt totdeauna 6-deoxihexoze. Glucidele poartă grupări N-, O- sau metil. La unele macrolide, glucidele sunt esterificate de un acil: grupul acetil sau izovaleril.

Fiecare compus are caracteristici chimice cât şi biologice, proprii:

- majoritatea celor care au cicluri formate din *14 atomi* de C sunt substanţe naturale (eritromicina, oleandomicina) sau derivaţi semisintetici (roxitromicina, diritromicina, claritromicina);
- un singur compus are *15 atomi* (azitromicina);
- compuşi naturali cu *16 atomi* (josamicina, spiramicina, kitasamicina, midecamicina şi tilosina) sau derivaţi semisintetici (rokitamicina, miocamicina, tilmicosina).

Eritromicina, cel mai important antibiotic macrolid, este produsă de *Streptomyces erythreus*. Structura sa constă dintr-un *inel lactonic macrociclic*, de care se ataşează două resturi de zahăr.



Structura moleculară a eritromicinei

Eritromicina este puţin solubilă în apă şi este rapid inactivată de sucul gastric. Ca şi alte macrolide, penetrează greu peretele bacteriilor Gram negative. Eritromicina este un antibiotic cu spectru larg: este activă faţă de bacteriile Gram pozitive şi Gram negative, faţă de actinomicete, *Mycobacterium, T. pallidum, Micoplasma pneumoniae, Chlamydia, Rickettsia*. În funcţie de concentraţie, de specie, de faza de creştere sau de densitatea inoculului, eritromicina poate fi bacteriostatică sau bactericidă. Eritromicina este un înlocuitor al penicilinei, la persoanele alergice pentru ciclul β-lactamic.

Cele mai multe antibiotice macrolide sunt substanţe bazice, iar unele sunt neutre. Pot fi solubile sau insolubile în apă, dar solubile în etanol. Cele folosite în clinică constau dintr-un inel lactonic cu 14, 15 sau 16 atomi de C, substituit cu două sau mai multe *glucide* neutre sau aminate la C_3 şi C_5.

Macrolidele inhibă creşterea bacteriilor dar nu sunt active faţă de fungi, iar lactonele polienice inhibă fungii, dar nu influenţează creşterea bacteriilor.

Spectrul de activitate al macrolidelor include bacteriile Gram pozitive (*Staphylococcus* şi *Streptococcus*) şi pe cele anaerobe (*Clostridium*). Bacteriile Gram negative (*H. pylori, Haemophilus* spp., *Pasteurella* spp. şi *Legionella* spp.) sunt de asemenea sensibile. Microorganismele enterice (*E. coli* şi *Salmonella*) sunt intrinsec rezistente, prin excluderea macrolidelor din citoplasmă datorită arhitecturii membranei externe.

Moleculele noi, ca *azitromicina* şi *claritromicina* au activitate antibacteriană superioară eritromicinei, deoarece au coeficienţi superiori de penetrare intracelulară şi tisulară, sunt mai stabile, mai uşor absorbite, iar efectele secundare gastrointestinale au o incidenţă mai scăzută. *Azitromicina* este activă faţă de bacteriile enterice. *Mycoplasma* spp. şi *Chlamydia* spp. sunt de asemenea sensibile la macrolide. *Claritromicina* are activitate antibacteriană semnificativă, *in vitro*, faţă de micobacteriile netuberculoase.

Macrolidele sunt antibiotice bacteriostatice, utilizate pentru tratamentul unui spectru larg de infecţii bacteriene ale tractului respirator cu *Legionella, Chlamydia, Haemophilus*, al unor specii de *Mycobacterium* (*M. intracellulare, M. avium*, dar nu *M. tuberculosis*), al ulcerului gastric asociat cu *H. pylori* şi infecţii ale ţesuturilor moi.

Streptograminele sunt reprezentate de doi compuşi (A şi B) cu acţiune sinergică. Ca şi macrolidele şi lincosamidele şi compuşii A şi B ai streptograminelor se fixează la subunitatea 50S a ribosomilor, la nivelul ARNr 23S.

Lincomicina şi clindamicina nu sunt macrolide, dar multe dintre proprietăţile lor biologice sunt asemănătoare cu ale eritromicinei. Sunt formate dintr-un *aminoacid* legat cu un zahăr aminat.

Lincomicina este activă faţă de o largă varietate de bacterii, în primul rând Gram-pozitive. Ele au aceleaşi situsuri de legare la subunitatea 50S ca şi macrolidele şi cloramfenicolul şi pot intra în competiţie pentru legare. Deşi sunt foarte diferite ca structură chimică, eritromicina şi clindamicina se leagă de subunitatea ribosomală 50S. Inhibă sinteza proteinelor prin interferenţă cu reacţia de transpeptidare, probabil prin blocarea situsului P (peptidil-donor). Astfel este blocată alungirea catenei peptidice. Efectul este bacteriostatic.

Macrolidele şi lincomicina sunt *bacteriostatice*: inhibă numai iniţierea noilor catene peptidice.

Utilizarea terapeutică a macrolidelor a fost sever compromisă de *emergenţa tulpinilor rezistente* ale multor specii de bacterii patogene. Fenomenul de rezistenţă a apărut curând după introducerea eritromicinei în terapie în anii '50. S-a observat că tulpinile rezistente la eritromicină, au devenit rezistente nu numai la toate celelalte macrolide, dar şi la lincosamidă şi streptogramină B, antibiotice neînrudite chimic cu macrolidele. De aceea, fenomenul s-a denumit «rezistenţa fenotipică la macrolide-lincosamide-streptogramină B» (MLS_B).

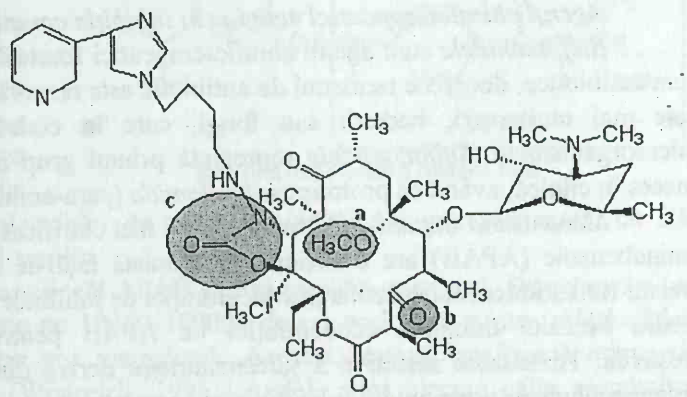
Rezistenţa la antibioticele MLS (macrolide, lincosamida şi streptogramina B) este indusă prin mai multe mecanisme:

- scăderea *permeabilităţii* peretelui celular la medicament;
- *efluxul* activ al medicamentului din celulă;
- modificarea mutaţională a unei singure *proteine* a subunităţii 50S;
- *inactivarea enzimatică* a antibioticelor: enzimele care hidrolizează inelul lactonic al nucleului macrolid şi fosfotransferazele care inactivează macrolidele prin fosforilarea grupării 2'-OH a glucidului aminat;
- *modificarea ARNr 23S* al subunităţii 50S prin *metilare*. Metilazele sunt codificate de genele *erm* (*erithromycin ribosome methylation*);

Rezistenţa la macrolide este cel mai adesea rezultatul modificării ţintei antibioticului şi constă în modificarea posttranscriere a ARNr 23S sub acţiunea adenin-N^6-metiltransferazei. Unele metilaze conferă rezistenţă numai la unul sau la două antibiotice ale clasei MLS_B. Enzimele de metilare adaugă una sau două grupe metil la un rest de adenină situat într-o poziţie fixă (A2058 la *E. coli*) a ARNr 23S. Metilarea are ca rezultat *schimbarea conformaţională a ribosomilor*, ducând la scăderea afinităţii pentru toate antibioticele MLS. Metilaza ribosomală conferă *rezistenţă încrucişată* la antibioticele MLS_B, deoarece situsurile de legare ale acestor antibiotice se suprapun.

Ketolidele reprezintă o nouă entitate chimică, caracterizată prin înlocuirea L-cladinozei din inelul A al eritronolidei, cu o funcţie 3-ceto şi un carbamat la C11-C12. Restul 3-OH rămas după înlăturarea L-cladinozei (un glucid neutru) a fost oxidat la grupul 3-ceto. Denumirea clasei derivă de la gruparea 3-ceto şi de la inelul lactonic (Ackermann, 2001, citat de Rodloff, 2003). *Telitromicina* şi *ABT 773* reprezintă cea mai recentă generaţie de medicamente, caracterizate prin grupul 3-cetonic ce substituie restul de zahăr 3-cladinoză din eritromicină şi claritromicină.

Ambele ketolide au gruparea carbamat C11-C12, care la telitromicină se extinde cu un grup alkil-aril. Această extensie permite telitromicinei să interacţioneze cu domeniul al II-lea al ARNr 23S (Vester, 2001).

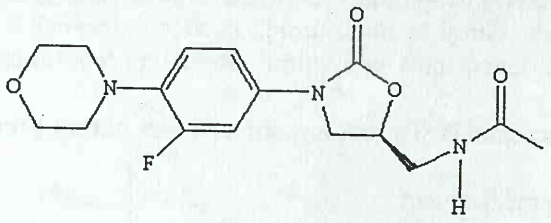


Structura moleculară a telitromicinei

Oxazolidinonele reprezintă o clasă unică de agenţi antimicrobieni sintetici. Utilizarea lor în clinică a fost impusă de necesitatea tratării infecţiilor produse de stafilococii rezistenţi la meticilină, de pneumococii rezistenţi la penicilină, de enterococii rezistenţi la vancomicină. Aceşti agenţi au un mecanism unic de acţiune, ceea ce elimină riscul rezistenţei încrucişate cu

agenţii antimicrobieni disponibili. Deoarece nu sunt molecule naturale, genele de rezistenţă specifică nu preexistă în genofondul natural. Oxazolidinonele au fost iniţial utilizate în terapie ca inhibitori ai monoamin-oxidazei, pentru tratamentul depresiei, dar ulterior s-a descoperit că au şi activitate antimicrobiană. Primul agent al acestei clase a fost produs de compania DuPont de Nemours, la sfârşitul anilor '70 pentru controlul bolilor foliare bacteriene şi fungice la diferite plante, inclusiv la tomate. Modificarea chimică a oxazolidinonei a dus la descoperirea a doi agenţi, *eperezolid* şi *linezolid*, cu activitate *in vitro* şi toxicitate diminuată.

Linezolidul are activitate *in vitro* faţă de *N. gonorrhoeae* şi *N. meningitidis* şi are o eficienţă bună faţă de multe bacterii Gram pozitive anaerobe (grupul *Bacteroides fragilis*). Bacteriile Gram negative sunt probabil intrinsec rezistente, deoarece posedă pompe de eflux, eficiente faţă de linezolid. *In vitro*, linezolidul are o eficienţă relativ bună faţă de *M. tuberculosis* şi foarte bună faţă de *Nocardia*.



Structura moleculară a linezolidului

Concentraţiile subinhibitorii de linezolid diminuează producerea hemolizinei şi coagulazei la *S. aureus* şi inhibă sinteza streptolizinei O şi DN-azei la streptococi.

Oxazolidinonele sunt *inhibitorii sintezei proteinelor ribosomale* la bacterii, dar spre deosebire de alţi agenţi antimicrobieni cu acţiune asupra ribosomilor, blochează prima treaptă a asamblării ribosomilor din subunităţile disociate. Oxazolidinonele se leagă de un situs al subunităţii 50S, la interfaţa sa cu subunitatea 30S şi previn formarea complexului de iniţiere 70S, care cuprinde ARNt-fMet, ARNm şi cele două subunităţi ribosomale.

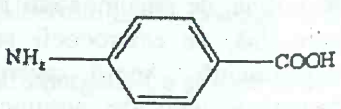
Linezolidul se leagă la sau lângă situsul de legare a cloramfenicolului şi lincomicinei, deoarece cele 3 molecule intră în competiţie pentru situsurile de legare din domeniul V al ARN 23S al subunităţii 50S. Domeniul V este centrul peptidil-transferazei, care catalizează formarea legăturii peptidice. Spre deosebire de cloramfenicol şi lincomicină, linezolidul nu inhibă formarea legăturilor peptidice şi între ele nu există rezistenţă încrucişată. Asemănător majorităţii inhibitorilor sintezei proteinelor ribosomale, activitatea linezolidului faţă de bacterii *in vitro* este considerată *bacteriostatică*, deoarece bacteriile sunt omorâte mai încet decât de agenţii bactericizi. Linezolidul este metabolizat prin oxidarea inelului morfolino şi se formează doi metaboliţi: acidul aminoetoxiacetic şi hidroxietil glicina. Linezolidul este un agent antimicrobian cu spectru larg, activ virtual faţă de toate bacteriile Gram pozitive. Întreaga cantitate administrată pe cale orală sau parenterală rămâne disponibilă acţiunii antimicrobiene. Perioada de înjumătăţire permite administrarea a două doze/zi.

Un parametru esenţial al unui agent chimioterapeutic este *indicele terapeutic*, adică raportul dintre doza toxică minimă şi doza cu eficienţă maximă. Valoarea mare a acestui raport este caracteristică agenţilor chimioterapeutici foarte eficienţi.

Agenţi chimioterapeutici activi prin inhibiţie competitivă (tabelul 66)

Sulfonamidele sunt agenţi chimioterapeutici foarte importanţi din punct de vedere practic. Nu sunt antibiotice, deoarece termenul de antibiotic este rezervat substanţelor sintetizate de organisme, de cele mai multe ori, bacterii sau fungi, care în concentraţii foarte mici inhibă sau omoară microorganismele. *Sulfonamidele* reprezintă primul grup de substanţe microbiostatice introduse cu succes în clinică, având ca prototip *sulfanilamida* (para-amino-benzen-sulfonamida).

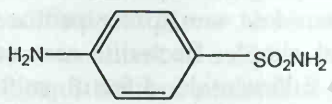
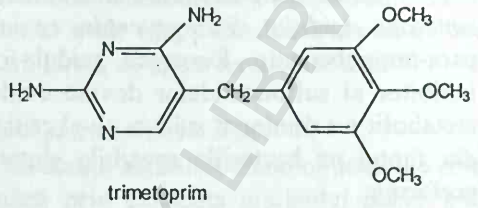
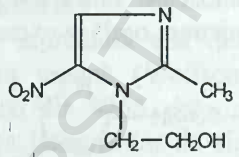
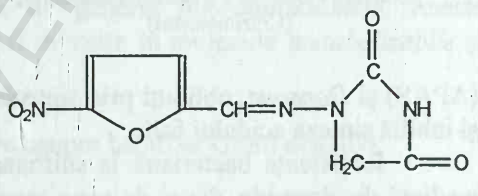
Mecanismul acţiunii sulfonamidelor a fost clarificat când Woods a demonstrat că acidul para-aminobenzoic (APAB) are o acţiune antagonistă faţă de aceste substanţe, în sensul că anihilează efectul lor antimicrobian: dublarea concentraţiei de inhibitor adăugat în mediu necesită dublarea concentraţiei de APAB pentru a relua creşterea. Toxicitatea selectivă a sulfonamidelor derivă din faptul că organismul uman preia acidul folic din surse externe, dar multe bacterii îşi sintetizează propriul acid folic.



Structura moleculară a acidului para-aminobenzoic (APAB)

Tabelul 66.

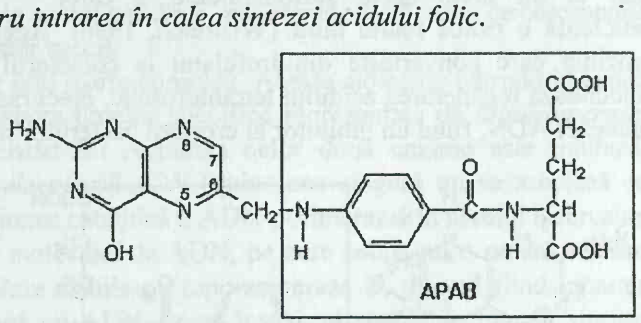
Agenţi chimioterapeutici care acţionează prin inhibiţie competitivă (adaptare după Topley şi Wilson's, 1998).

Clasa de agenţi chimioterapeutici	Ţinta specifică	Structura chimică
Sulfonamide	Inhibarea dihidropteroid sintetazei (DHPS)	 sulfonamide
Diaminopirimidina (Trimetoprim)	Inhibarea dihidrofolat reductazei	 trimetoprim
Nitroimidazoli	Interferă cu biosinteza timinei (produc ruperi ale moleculei de ADN)	 metronidazol
Nitrofurani (Nitrofurantoil)	Interferă cu biosinteza timinei (produc ruperi ale moleculei de ADN).	 nitrofurantoil

Acţiunea-antagonistă a APAB nu este directă, ci se exercită prin intermediul metabolismului bacterian. APAB este un nutrient esenţial, fiind precursorul *acidului folic*, un factor de creştere pentru bacterii. Acidul folic şi formele sale reduse – acidul dihidrofolic şi tetrahidrofolic – transferă fragmente cu 1C derivate din serină, pentru sinteza metioninei, purinelor, timinei, tiaminei, pantotenatului (Black, 1996).

Datorită marii asemănări a structurii chimice a celor două substanţe (APAB şi sulfanilamida), între ele are loc un fenomen de *competiţie pentru intrarea în calea sintezei acidului folic*.

Enzima bacteriană implicată în conversia APAB la *acid folic* (pteridin-sintetaza), adeseori "greşeşte" şi se combină cu sulfanilamida, în loc de APAB. Astfel, sinteza acidului folic şi toată calea metabolică dependentă de acidul folic este blocată. Sulfanilamida intră în competiţie cu APAB pentru situsul activ al enzimei. Acest tip de inhibiţie este reversibil: dacă sulfanilamida este îndepărtată, enzima funcţionează normal. Cu cât raportul moleculelor de sulfanilamidă/APAB este mai mare, cu atât inhibiţia metabolismului bacterian este mai amplă.



Structura moleculară a acidului folic

Sulfonamidele au afinitate mai mare decât APAB pentru pteridin-sintetază. *Trimetoprim* (un analog al acidului dihidrofolic) are afinitate de 10000–100000 de ori mai mare pentru *dihidrofolat-reductaza* (DHFR) bacteriană decât pentru cea mamaliană. Această enzimă catalizează conversia dihidrofolatului la acidul tetrahidrofolic (Wistreich, 1996). Astfel, sunt blocate căile metabolice dependente de acidul folic, care acţionează ca purtător al grupărilor C1 şi este necesar pentru sinteza

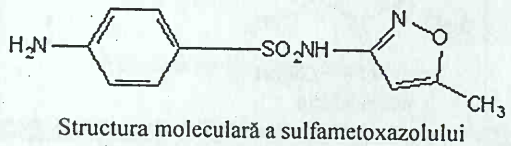
UMF "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

ADN, ARN etc. Spre deosebire de mamifere, bacteriile şi protozoarele parazite nu au sistem de transport care să preia acidul folic preformat din mediul extern. Majoritatea acestor organisme trebuie să-l sintetizeze, deşi unele pot să folosească timidina exogenă, acoperind astfel necesarul metabolic.

Sulfamidele sunt toxice pentru bacteriile capabile să sintetizeze acidul folic, pornind de la molecule mai simple. Bacteriile care necesită aportul exogen al moleculelelor preformate, nu sunt sensibile la sulfonamide. Efectul sulfonamidelor este antagonizat necompetitiv (independent de creşterea concentraţiei) de un amestec de intermediari ai căii acidului folic.

Sulfanilamida inhibă sinteza acidului folic în stadiul timpuriu, prin inhibiţie competitivă cu *sintetaza acidului dihidropteroic*, enzima care catalizează condensarea dihidropteridinei cu acidul para-aminobenzoic. Deoarece acidul folic îşi păstrează activitatea în celulele bacteriene, efectul inhibitor al sulfonamidelor devine evident după câteva generaţii de celule, când cantitatea acestui metabolit s-a diminuat sub un nivel critic, prin distribuţie în celulele fiice. Toxicitatea selectivă derivă din faptul că bacteriile sensibile sintetizează acidul folic *de novo*, iar omul absoarbe cofactorul preformat.

Cele mai cunoscute sulfonamide sunt *sulfadiazina* şi *sulfametoxazol* (cotrimoxazol), bine absorbite după administrare orală şi excretate în urină.



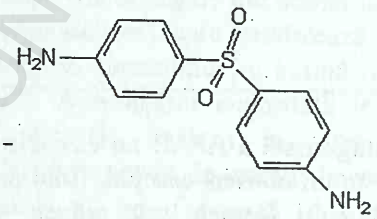
Structura moleculară a sulfametoxazolului (Cotrimoxazol)

Acţiunea derivaţilor sulfanilamidei este bacteriostatică faţă de bacteriile Gram pozitive şi Gram negative. Se folosesc în tratamentul infecţiilor vezicii urinare, cauzate în marea lor majoritate de *E. coli*. Circa 5% dintre pacienţi suferă efecte secundare, mai ales reacţii alergice, cu febră şi eritem tegumentar.

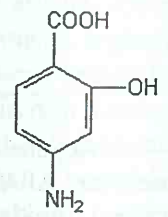
Ca şi sulfamidele, *acidul paraaminosalicilic* (APAS) şi *Dapsone*, obţinuţi prin sinteză chimică sunt inhibitori competitivi ai metabolismului APAB şi inhibă sinteza acidului folic.

Rezistenţa bacteriană la sulfonamide este mediată de plasmide, dar şi de gene cromosomale, prin hiperproducţia de acid p-aminobenzoic.

Familia derivaţilor *diaminopirimidinici* cuprinde *trimetoprim* şi *tetroxoprim*.

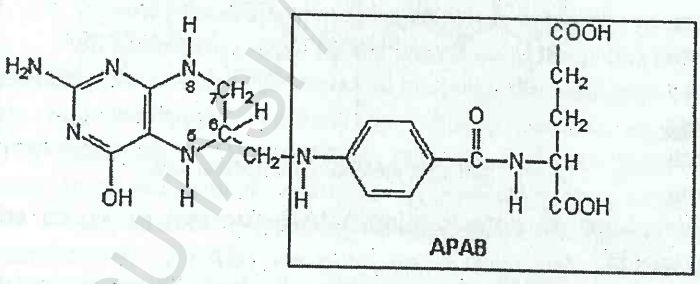


Structura moleeulară a Dapsone



Structura moleculară a APAS (Acid para-aminosalicilic)

Trimetoprim este un analog al *acidului dihidrofolic*, component esenţial al sintezei aminoacizilor şi nucleotidelor. Agentul chimic blochează metabolismul dependent de acidul folic, dar la alt nivel decât sulfonamidele, a căror eficienţă o ridică foarte mult (Wistreich, 1996). Agentul inhibă competitiv *dihidrofolat-reductaza*, enzima care converteşte dihidrofolatul la cofactorul activ – *acidul tetrahidrofolic*. Trimetoprim blochează regenerarea acidului tetrahidrofolic, precursorul acidului folinic şi ulterior al purinelor şi al sintezei ADN, fiind un inhibitor al creşterii bacteriilor mai eficient decât sulfonamida.



Structura moleculară a acidului tetrahidrofolic

Blocajul secvenţial al aceleiaşi căi de biosinteză, sub acţiunea sulfonamidelor şi trimetoprim, determină un grad înalt de activitate sinergică faţă de un spectru larg de microorganisme.

Omul nu sintetizează acidul folic, dar necesită aportul exogen şi sinteza purinelor în celula umană nu este influenţată semnificativ de trimetoprim. Are acţiune selectivă deoarece este de 50.000–100.000 de ori mai activ faţă de dihidrofolat-reductaza bacteriană, comparativ cu cea umană.

Trimetoprim are spectru larg de acţiune: coci Gram pozitivi şi majoritatea bacililor Gram negativi, cu excepţia *Ps. aeruginosa* şi *Bacteroides*.

Rezistența mediată de gene cromosomale ori plasmidiale, este consecința dobândirii unei gene a dihidrofolat-reductazei (DHFR), mult mai puțin sensibilă la trimetoprim sau altor mecanisme: supraproducția DHFR, mutații ale genei structurale a DHFR sau dobândirea unei gene care codifică o enzimă rezistentă la DHFR. Genele ce codifică enzimele modificate se găsesc frecvent pe plasmide autotransferabile. Enzimele modificate sunt produse în celule, concomitent cu o dihidrofolat-reductază de tip sălbatic, dar cantitatea enzimei alterate depășește blocajul sintezei acidului folic mediat de efectul trimetoprimului asupra enzimei de tip sălbatic. Rezistența la sulfonamide se produce printr-un mecanism asemănător. Datorită rezistenței bacteriilor la sulfonamide, trimetoprim a fost introdus ca un sinergic al sulfonamidelor, în asociație cu care s-a administrat mult timp, considerându-se că are proprietăți antibacteriene slabe. Acum se administrează pe scară largă, ca agent terapeutic unic.

Agenți chimioterapeutici activi prin inhibiția replicării și transcrierii ADN

Quinolonele (denumite și 4-quinolone) sunt primele substanțe antimicrobiene obținute pe *cale sintetică* și formează o familie de compuși care se aseamănă prin existența nucleului *quinolinic*. Primul compus din acest grup, folosit în terapie este *acidul nalidixic*.

Quinolonele, alături de β-lactamice și macrolide, reprezintă una dintre cele trei familii principale de agenți antimicrobieni folosiți în terapeutica umană (Wolfson & Hooper, 1989). Importanța lor terapeutică este în continuă creștere începând din 1968, data comercializării primei quinolone, *acidul nalidixic*. Acidul nalidixic este un produs intermediar de sinteză a quinolonelor. Ulterior quinolonele s-au diversificat prin introducerea unui atom de *fluor* (F) în poziția 6 și a unui *heterociclu* în poziția 7 (piperazine, pirolidina etc.) care au generat *fluoroquinolonele*. Aceste molecule posedă un spectru antibacterian foarte larg și pot fi divizate în molecule *metabolizabile* și *nemetabolizabile* (grupele III și IV).

Quinolonele se pot clasifica în două grupe:

- cele de primă generație, ca *acidul nalidixic*, active asupra bacililor Gram negativi;
- de generația a II-a – *fluoroquinolonele*.

Gama derivaților quinolonei s-a diversificat prin modificarea nucleului de bază, 4-quinolona. La atomul C6 s-a adăugat unul de *fluor*, ceea ce a crescut semnificativ spectrul și potențialul lor antimicrobian. Având în vedere spectrul lor de activitate antibacteriană, limitat la bacterii Gram negative și în principal la enterobacterii, acidul nalidixic și derivații săi au fost folosiți pentru tratamentul infecțiilor urinare. Modificările structurii au dat naștere la quinolone, denumite *noile quinolone* sau *fluoroquinolone* (norfloxacin, pefloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin etc.), al căror spectru de activitate antibacteriană se extinde la alte specii Gram negative (de exemplu, *Ps. aeruginosa*), dar și la anumite specii Gram pozitive (*S. aureus*) și micobacterii. Totuși, activitatea noilor quinolone față de alte specii, așa cum sunt cele natural-sensibile la acidul nalidixic, rămâne modestă, ceea ce corespunde unui anumit grad de rezistență intrinsecă a acestor specii.

Mecanismul de acțiune a quinolonelor este foarte complex. Aceste molecule pătrund în celula bacteriană prin *difuzie pasivă* și acționează asupra țintelor specifice reprezentate de *topoizomeraze*: *ADN-giraza (topoizomeaza II)* și *topoizomeraza IV*. Acțiunea celor două enzime este inhibată. Quinolonele se leagă și *stabilizează complexele girază-ADN* (quinolona singură nu se asociază cu ADN), după clivarea lanțului, împiedicând acțiunea catalitică a ADN-polimerazei la nivelul bifurcației de replicare. Complexul generează o rupere a moleculei de ADN, pe care celula nu o repară eficient (fig. 368). Fluoroquinolonele formează *complexe* stabile cu topoizomeraza II, efectul fiind moartea celulei. S-a sugerat că quinolonele nu se leagă cu ADN-giraza însăși, ci probabil chiar la situsuri specifice pe ADN, create de ADN-girază.

Studiile comparative ale sensibilității la fluoroquinolone și de dezvoltare a rezistenței au relevat că ADN-giraza este ținta primară a fluoroquinolonelor la bacteriile Gram negative, iar topoizomeraza IV este ținta primară la bacteriile Gram pozitive. Excepția o constituie *Streptococcus pneumoniae*, la care fie giraza, fie topoizomeraza pot fi ținte primare, în funcție de fluoroquinolona folosită.

Activitatea antibacteriană este dependentă într-o măsură semnificativă de atomul de fluor din poziția 6 și de nucleul piperazinic din poziția 7. Configurația spațială a quinolonei determină nivelul activității. Astfel, enantiomerii stereochimici (care diferă unul de altul numai prin poziția în spațiu a

unei grupări particulare), ce implică grupul metil ataşat la inelul al III-lea de ofloxacin, au activităţi antibacteriene foarte diferite, care diferă în proporţie de 1/10.

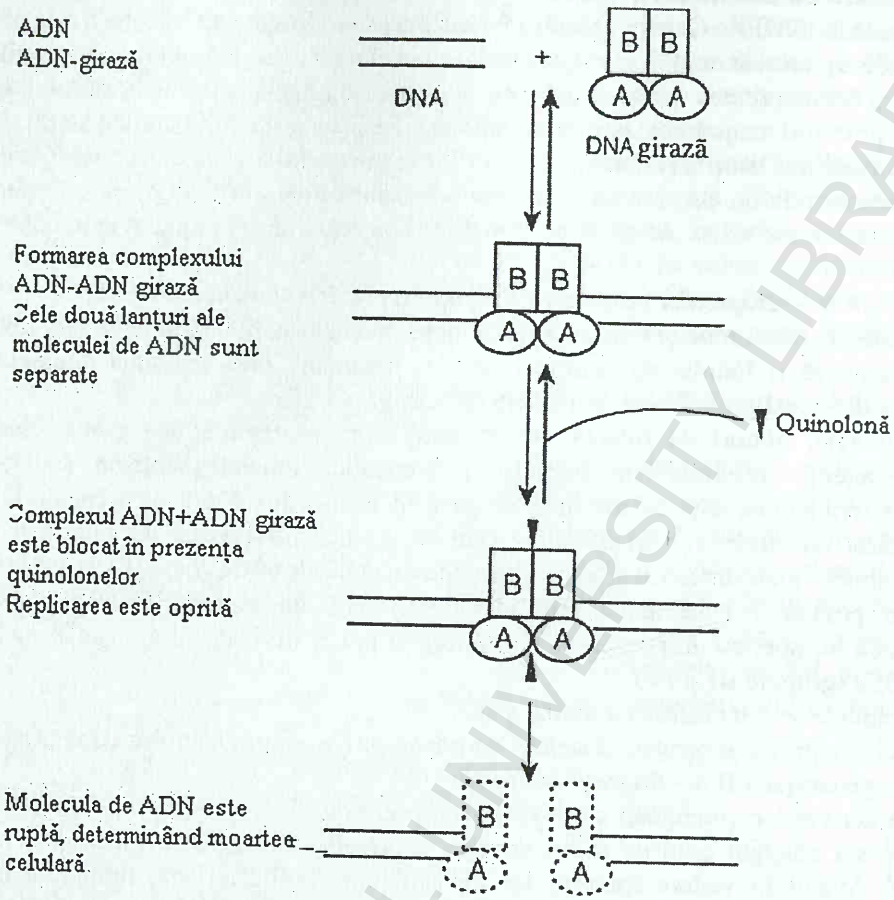


Fig. 368. Ilustrarea schematică a mecanismului acţiunii quinolonelor (după Drlica, 1999)

Quinolonele sunt agenţi bactericizi. Ele stopează rapid sinteza replicativă a ADN şi întrerup progresia bifurcaţiei de replicare. Inhibiţia activităţii ADN-girazei sub acţiunea fluoroquinolonelor induce moartea rapidă a celulei bacteriene. Inhibiţia rapidă a sintezei ADN nu explică moartea celulei bacteriene. Pentru efectul letal sunt necesare alte evenimente suplimentare: inhibiţia sintezei ARN şi a proteinelor. La concentraţiile de quinolone care depăşesc un anumit prag, activitatea bactericidă diminuează, probabil pentru că este inhibată numai sinteza ARN şi a proteinelor.

Quinolonele induc probabil efecte pleiotrope, ce pot fi consecinţe secundare ale inhibiţiei sintezei ADN-girazei: leziuni ale ADN bacterian, deoarece quinolonele sunt inductoare ale sistemului reparator SOS, dependent de Rec A.

Noile quinolone au reprezentat un real progres terapeutic având în vedere caracteristicile acţiunii lor antibacteriene (spectru larg, activitate bactericidă şi farmacocinetică). Aceasta explică spectaculoasa creştere a utilizării lor în ultimii 10 ani. Dar, utilizarea extensivă a noilor quinolone s-a tradus prin emergenţa îngrijorătoare a tulpinilor rezistente a unor specii bacteriene de mare importanţă medicală (enterobacteriile, *Ps. aeruginosa, S. aureus, M. tuberculosis, N. gonorrhoeae*) şi a tulpinilor multirezistente la alte antibiotice.

Mecanismele rezistenţei bacteriene la fluoroquinolone sunt de trei categorii:

- modificări ale enzimelor ţintă ale medicamentelor;
- alterări care limitează accesul medicamentelor la ţintă;
- activitatea pompelor de eflux.

Rezistenţa la quinolone este, predominant, consecinţa *modificărilor enzimei ţintă*, la situsurile active ale enzimei.

BCU "VASILE GOLDIŞ" WESTERN UNIVERSITY LIBRARY

Rezistența la quinolone este, predominant, consecința *modificărilor enzimei țintă*, la situsurile active ale enzimei.

ADN giraza și topoizomeraza IV sunt localizate în citoplasma bacteriană. Pentru a-și atinge ținta, antibioticele fluoroquinolonice trebuie să traverseze învelișul celular. Modificările structurale ale membranei externe a bacteriilor Gram negative asociate cu *diminuarea înglobării* sunt factori importanți ai rezistenței la fluoroquinolone. Variantele Gram negative rezistente la quinolone care se selectează, se datorează modificării porinelor din membrana externă, asociate cu scăderea permeabilității. Rezistența la quinolone nu este transferabilă prin intermediul plasmidelor. La bacteriile Gram pozitive, scăderea ratei înglobării nu s-a demonstrat a fi un mecanism al rezistenței.

Atât bacteriile Gram pozitive, cât și cele Gram negative pot dobândi un nivel scăzut al rezistenței, mediat de activitatea *pompelor de eflux*, cu rol de transportori multipli, a căror activitate este dependentă de gradientul electrochimic (forța proton motrice).

Nu s-au identificat enzime cu efect inactivator față de quinolone.

Ciprofloxacina are un potențial antibacterian mult mai ridicat decât acidul nalidixic. Efectul bactericid al ciprofloxacinului este rapid, cu o pierdere de 90% a viabilității, într-un interval de 19 minute. Ciprofloxacina se folosește în tratamentul infecțiilor respiratorii, ale tractului urinar, gonoreii, pentru tratamentul infecțiilor diareice cu tulpinile enterotoxice de *E. coli*, *Campylobacter jejuni, Shigella* sp. Este activă, de asemenea, față de *M. tuberculosis*. Este parțial metabolizată de ficat și excretată de rinichi. Medicamentele antiacide (Maloox) blochează absorbția ciprofloxacinei și nu vor fi administrate concomitent. Administrată împreună cu teofilina, ciprofloxacina poate duce la acumularea unor niveluri sanguine înalte ale teofilinei. Ionii de Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Zn pot să lege ciprofloxacina și diminuează mult absorbția medicamentului.

Multe antibiotice, inclusiv ciprofloxacina, pot altera microbiota normală a colonului, favorizând dezvoltarea bacteriilor care produc inflamația mucoasei (colita pseudomembranoasă) și determină tulburări diareice. Colita pseudomembranoasă se datorează creșterii în exces a bacteriei *Clostridium difficile* și poate induce stări febrile, durere abdominală, tulburări ale tranzitului intestinal și chiar starea de șoc. Tratamentul cu ciprofloxacină poate duce la creșterea în exces a levurii *Candida albicans*, cu localizare vaginală (vaginită) sau intestinală (disbioza).

Manifestarea efectelor secundare este prevenită prin administrarea probioticelor: *Lactobacillus casei, L. acidophilus, Bifidobacterium longum, Saccharomyces cerevisiae.*

Derivații quinolonici se folosesc pentru tratamentul infecțiilor căilor urinare, unde, după administrare orală, se acumulează în concentrații inhibitorii. Fluoroquinolonele pătrund în țesutul prostatic la concentrații care echivalează sau depășesc de câteva ori pe cele din plasmă.

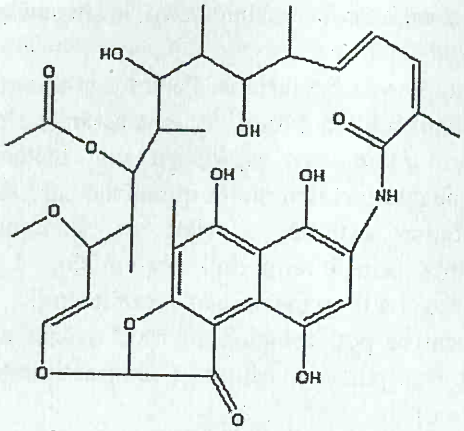
Cele mai sensibile la acțiunea quinolonelor sunt enterobacteriile, dar compușii grupului sunt activi față de chlamidii și micobacterii.

Quinolonele au efect antimicrobian prelungit după administrare, ceea ce se reflectă în continuarea supresiei creșterii bacteriene, după eliminarea agentului antimicrobian din organism. Dacă un medicament are un efect persistent după administrare, înseamnă că poate fi eficient chiar în intervalele dintre doze, când nivelul seric și tisular au scăzut sub nivelul concentrației minime inhibitorii.

Quinolonele își păstrează activitatea față de multe bacterii rezistente la antibiotice, inclusiv față de bacilii Gram negativi cu rezistență multiplă, față de *S. aureus* rezistent la meticilină, față de *N. gonorrhoeae* rezistent la penicilină, față de *Haemophilus influenzae* producător de β-lactamaze.

Ciprofloxacina, ofloxacina și tosufloxacina sunt active față de *Chlamydia trachomatis* și *Mycoplasma hominis*. Quinolonele sunt de asemenea active față de *Rickettsia* spp.

Acidul nalidixic inhibă numai speciile de bacterii Gram negative aerobe. În molecula de ciprofloxacină, fluorul conferă activitate față de bacteriile Gram pozitive. Grupul piperazinic crește activitatea față de enterobacterii, iar gruparea piperazină și ciclopropil conferă activitate față de speciile de *Pseudomonas*.

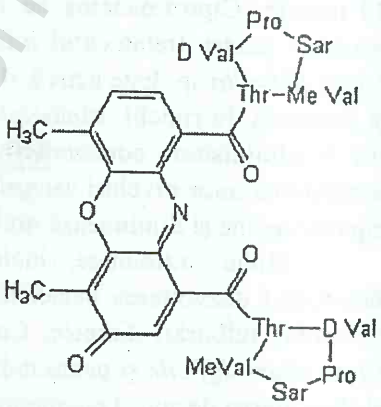


Structura moleculară a rifampicinei B

Rifampicina B este sintetizată natural, iar *rifampicina* este derivatul semisintetic cu cea mai largă utilizare clinică. Rifampicina este alcătuită dintr-o grupare cromoforă aromatică, inclusă într-o catenă alifatică. Ea se asociază cu subunitatea B a ARN-polimerazei dependente de ADN şi probabil chiar cu ADN în complexul de iniţiere, blocând astfel *iniţierea transcrierii* şi sinteza ARN. Antibioticul se foloseşte în terapia combinată a tuberculozei. Mutantele rezistente, cu subunitatea B a ARN-polimerazei modificată se selecţionează repede.

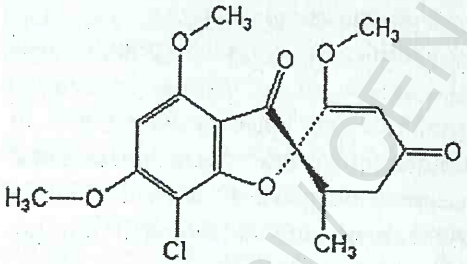
Actinomicina D (Dactinomicina) este formată dintr-o grupare cromoforă aromatică şi un ciclu peptidic. Ea interacţionează cu ADN şi *inhibă replicarea* şi *transcrierea.* Gruparea aromatică se intercalează în dublul helix al ADN, la perechile GC, iar peptidul ciclic rămâne la suprafaţă.

Novobiocina interferă cu sinteza ARN, deoarece inhibă ARN-polimeraza dependentă de ADN, iar *griseofulvina inhibă replicarea ADN*, consecutiv interferenţei cu polimerizarea nucleotidelor purinice. Cercetări recente sugerează că novobiocina acţionează asupra subunităţii B a ADN-girazei (topoizomeraza II) care produce şi menţine starea supraspiralizată a ADN.



Structura moleculară a actinomicinei D

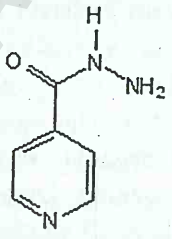
Griseofulvina sintetizată de *Penicillium griseofulvum* a fost izolată ca un factor care produce dezvoltarea anormală (răsucirea) a hifelor fungice. Se foloseşte pentru tratamentul infecţiilor fungice superficiale; inhibă creşterea fungilor micelieni, dar nu este activă faţă de bacterii sau levuri; nu influenţează creşterea fungilor cu pereţi celulozici, dar inhibă creşterea fungilor care conţin *chitină*. Griseofulvina influenţează celulele fungice prin contact direct: creşterea hifelor aeriene nu este modificată. Concentraţiile mici produc răsucirea hifelor, ramificarea extensivă, micşorarea distanţei dintre pereţii transversali, creşterea diametrului. La concentraţii mari de antibiotic, modificările de creştere se amplifică şi hifele se rup.



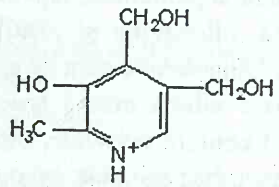
Structura moleculară a griseofulvinei

Antibioticele care interacţionează cu ADN produc efecte nediscriminatorii asupra ADN bacterian, viral sau al celulei eucariote.

Alţi agenţi chimioterapeutici de sinteză. Hidrazida acidului nicotinic (izoniazida, INH), introdusă în clinică înainte de 1950, împreună cu rifampina, formează baza chimioterapiei antituberculoase. Izoniazida este un derivat al nicotinamidei. Mecanismul de acţiune nu este cunoscut, dar influenţează sinteza lipidelor, acizilor nucleici şi acidului micolic la *M. tuberculosis*.



Structura moleculară a izoniazidei

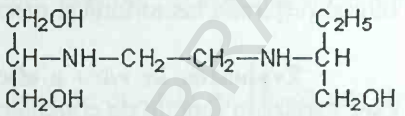


Structura moleculară a piridoxinei (vitamina B_6)

BCU IAŞI / CENTRUL UNIVERSITAR BRAILA

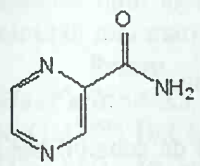
Se presupune că izoniazida este activă prin competiţie cu *piridoxina* (vitamina B_6) necesară creşterii celulelor de *M. tuberculosis*, sau inhibă sinteza *acizilor micolici* (acizi graşi specifici acestor bacterii). Este bactericidă faţă de celulele care cresc şi se divid şi are acţiune bacteriostatică faţă de celulele care nu se multiplică. Toate cele trei (PASA, dapsone şi izoniazida) se folosesc pentru tratamentul infecţiilor cu *Mycobacterium*.

Etambutolul, pirazinamida şi *etionamida* blochează reacţiile enzimatice în celula bacteriană, deoarece sunt similare dar nu identice cu vitaminele bacteriene.



Structura moleculară a etambutolului

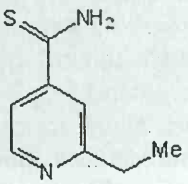
Etambutolul inhibă arabinozil-transferaza, enzimă implicată în biosinteza arabinogalactanului şi lipoarabinomananului. Alte efecte atribuite acţiunii etambutolului sunt inhibiţia metabolismului ARN şi sintezei fosfolipidelor, inhibiţia transferului acizilor micolici la arabinogalactanul legat de peretele celular mureinic, sinteza spermidinei şi inhibiţia unei trepte timpurii a conversiei glucozei în monozaharidele utilizate pentru sinteza polizaharidelor parietale (arabinogalactan, arabinomanan) şi a peptidoglicanului. Este un medicament foarte specific şi eficient, utilizat în asociaţie cu izoniazida, pentru tratamentul tuberculozei. Are efect bacteriostatic. Nu se cunoaşte mecanismul care determină rezistenţa la etambutol (Musser, 1995).



Structura moleculară a pirazinamidei

Pirazinamida este un derivat sintetic al nicotinamidei. Nu se cunoaşte mecanismul de acţiune, nici baza moleculară a rezistenţei. Unele tulpini sensibile la pirazinamidă au o enzimă specifică (pirazinamidaza), ce metabolizează pirazinamida la acidul *pirazinoic*, intermediarul activ antibacterian. Tulpinile rezistente la pirazinamidă au pierdut activitatea pirazinamidazică. S-au identificat şi tulpini foarte rezistente la pirazinamidă, care au şi activitate pirazinamidazică. Aceasta sugerează că, în plus faţă de pierderea capacităţii de sinteză a pirazinamidazei, există şi alte mecanisme de rezistenţă.

Etionamida, derivată a acidului izonicotinic, este activă faţă de *M. tuberculosis* şi alte micobacterii. *In vitro*, celulele de *M. tuberculosis* îşi pierd acidorezistenţa. Se crede că mecanismul său de acţiune implică *inhibiţia sintezei acizilor micolici*.



Structura moleculară a etionamidei

Nu se cunosc mecanismele rezistenţei la etionamidă şi la izoniazidă.

Metronidazolul a fost introdus în clinică în 1959 pentru tratamentul infecţiei cu *Trichomonas vaginalis*. Ulterior s-a demonstrat eficienţa sa faţă de infecţiile cu bacterii anaerobe şi faţă de alte infecţii parazitare. Difuzează bine în ţesuturi, inclusiv în sistemul nervos. Are cea mai bună activitate bactericidă, dintre toate medicamentele active faţă de bacteriile anaerobe.

Acţiunea sa constă în *activarea reductivă* a grupăriii *nitro*. Metronidazolul acţionează ca acceptor preferenţial de electroni (e^-), fiind redus de proteinele transportoare de e^- cu potenţial redox scăzut. Reducerea scade concentraţia sa, ceea ce menţine un gradient ce favorizează încorporarea medicamentului în celulă şi generarea produselor intermediare ale reducerii, cu efecte toxice pentru celulă. Toxicitatea se datorează compuşilor intermediari sau radicalilor liberi ce interacţionează cu ADN şi probabil cu alte molecule, producând leziuni. Intermediarii citotoxici se descompun în produse finale netoxice şi inactive: acetamida şi acidul 2-hidroxietil oxamic. Efectul asupra microbiotei intestinale este minim, deoarece medicamentul este redus în condiţii anaerobe.

Methenamina este produsul ciclic de condensare a formaldehidei şi amoniului. Are activitate antibacteriană slabă, dar la pH acid, fiecare moleculă hidrolizată generează 4 molecule de amoniu şi 6 molecule de formaldehidă:

$$(N_4CH)_6 + 6\,H_2O + 4\,H^+ \longrightarrow 4\,NH_4^+ + 6\,HCHO$$

Este excretată în urina acidă, unde este hidrolizată şi formaldehida eliberată este bactericidă. Este disponibilă ca sare a acidului mandelic sau hipuric pentru acidifierea urinii. Nu s-a descris rezistenţa la formaldehidă, dar tulpinile de *Proteus*, care produc frecvente infecţii urinare sunt rezistente, deoarece ureaza lor clivează ureea la CO_2 şi NH_3 şi alcalinizează urina.

Derivații *nitrofuranului* (furazolidon, nitrofurantoina, nitrofuratel, nitrofurazon) au efect bacteriostatic față de bacteriile Gram pozitive și Gram negative. Cel mai utilizat este *nitrofurantoina*. Derivații nitrofuranului se folosesc pentru terapia infecțiilor tractului urinar, deoarece realizează concentrații suficient de mari în urină. Nu au acțiune sistemică. Un intermediar redus al nitrofuranilor produce ruperea catenei de ADN, ceea ce explică efectele mutagene ale acestor compuși *in vitro*. Sunt activate mecanismele de reparare a ADN. Metaboliții reactivi reduși ai nitrofurantoinei interferă nu numai cu ADN, ci par a fi capabili să se lege cu proteinele ribosomale și inhibă sinteza proteinelor. Inhibă respirația bacteriană și metabolismul piruvatului.

Evaluarea *in vitro* a eficienței unui antibiotic se realizează prin măsurarea a 3 parametri, care variază în funcție de concentrația antibioticului și de timpul său de acțiune:

- ✓ *concentrația minimă activă* (= **C.M.A.**) – este concentrația la care antibioticul poate induce anumite perturbări în activitatea metabolică a microorganismelor, fără a afecta capacitatea de multiplicare și viabilitatea acestora;
- ✓ *concentrație minimă inhibitorie* (= **C.M.I.**) – este concentrația la care un antibiotic inhibă multiplicarea microorganismelor (efect bacteriostatic);
- ✓ *concentrație minima bactericidă* (= **C.M.B.**) – este concentrația la care un antibiotic are acțiune letală asupra microorganismelor (efect bactericid).

Metode calitative de determinare a spectrului de sensibilitate la antibiotice

Metoda difuzimetrică (Kirby-Bauer)

Este o metodă foarte simplă și rapidă, care permite determinarea spectrului de sensibilitate a microorganismului la diferite antibiotice. Metoda are mai multe variante, în practică folosindu-se curent tehnica discurilor impregnate cu antibiotice, standardizată, recomandată de NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standardisation*), în prezent CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute).

O serie de factori, ca de exemplu, tulpina microbiană studiată (densitatea inoculului, specia, vârsta culturii), mediul de cultură (compoziția mediului, valoarea pH, densitatea și grosimea stratului de mediu), tehnica folosită și criteriile de interpretare a rezultatelor obținute, pot influența rezultatele unei antibiograme. Din acest motiv, tehnica trebuie efectuată în condiții standardizate, reproductibile, conform indicațiilor forurilor internaționale în domeniu.

Pe suprafața unui mediu agarizat însămânțat "în pânză" cu un inocul standardizat, obținut din tulpina de testat, se plasează la distanțe egale discuri impregnate cu soluții de antibiotice de o anumită concentrație care vor difuza în mediu, realizând un gradient de concentrație invers proporțional cu diametrul zonei de difuzie, deci cu distanța față de disc. Dacă tulpina este sensibilă la un anumit antibiotic, creșterea microbiană va fi inhibată pe o anumită suprafață în jurul discului impregnat cu antibioticul respectiv, suprafață denumită *zonă de inhibiție a creșterii*.

Citirea rezultatelor se realizează prin măsurarea diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii determinate de diferite antibiotice, cu ajutorul unei *rigle gradate*. În cazuri de urgență clinică se poate realiza o primă citire la 6–8 h de la incubare. Interpretarea rezultatelor se face în funcție de dimensiunea zonelor de inhibiție a creșterii, exprimând rezultatul cu termenii de tulpină *sensibilă* (*S*), *rezistentă* (*R*) sau *intermediar sensibilă* (*I*), conform tabelelor cu puncte critice standardizate și corespunzătoare metodei de lucru: tabelele NCCLS pentru metoda difuzimetrică recomandată. Termenii S, I, R definesc de fapt și categoriile de antibiotice, în funcție de efectul lor clinic, după cum urmează:

- ❖ categoria **S**, înseamnă că există o mare probabilitate ca antibioticul, administrat în doze obișnuite, să elimine infecția determinată de tulpina testată (C.M.I. are valori net inferioare celor ale concentrațiilor umorale obținute în urma administrării unei doze obișnuite);
- ❖ categoria **I**, semnifică probabilitatea ca antibioticul să fie eficient *in vivo* prin administrare locală sau prin realizarea în mod fiziologic a concentrațiilor mari în organele sau țesuturile (rinichi, ficat, căi biliare), la nivelul cărora este localizat procesul infecțios;
- ❖ categoria **R** înseamnă că, cel mai probabil, administrarea antibioticului nu va determina eliminarea din organism a agentului infecțios a cărui sensibilitate a fost testată sau rezultatul tratamentului este imprevizibil;

❖ categoria **NS** (non-sensibilitate), raportată pentru antibioticele pentru care nu există puncte critice de separare între cele 3 categorii, S, I, R.

La citirea şi interpretarea rezultatelor se iau în considerare diametrele zonelor de inhibiţie, lipsite complet de colonii vizibile cu ochiul liber.

Apariţia coloniilor la marginea sau în interiorul zonei de inhibiţie se poate datora următorilor factori: cultura este mixtă sau suprainfectată; cultura este pură, dar prezintă celule heterorezistente; apariţia mutantelor rezistente; dezvoltarea tardivă a unor celule, de fapt sensibile, şi apariţia coloniilor după ce antibioticul s-a diluat prin difuzie în mediu.

Prepararea inoculului

Metoda în mediu lichid: se repică 3–5 colonii egale din placa de dipersie de 18–24 ore, se suspensă în 5 ml de mediu lichid (Brain-Heart, Todd Hewitt, Tripticase soia etc.) şi se incubează la 35°C timp de 2–6 ore, până la obţinerea unei turbidităţi de 0,5 pe scara Mac Farland – densitate optică la λ 550 nm, de 0,125. Dacă turbiditatea este superioară, cultura se diluează cu ser fiziologic steril.

Metoda suspensionarii directe a coloniilor: se repică un număr de colonii de pe placa cu cultură de 18 ore şi se suspensă în ser fiziologic steril, pentru obţinerea unei turbidităţi echivalente cu cea a etalonului 0.5 MacFarland – densitatea optică la λ 550 nm este 0,125 (fig. 369). Se agită cu ajutorul unui agitator vortex, timp de 15–20 secunde. Se calibrează suspensia prin adăugarea unei cantităţi mai mari sau mai mici de soluţie clorurată izotonică până la obţinerea densităţii optice dorite.

Pentru ***prepararea standardului MacFarland 0,5,*** se amestecă 0,5 ml $BaCl_2$ 0,048 M (1,175% $BaCl_2 + 2H_2O$), 99,5 ml H_2SO_4 0,18 M (1% v/v), se agită continuu şi se controlează absorbţia la 625 nm, care trebuie să fie 0,08–0,10. Se distribuie volume de 4–6 ml în tuburi cu dop filetat. Se păstrează la întuneric, la temperatura ambiantă.

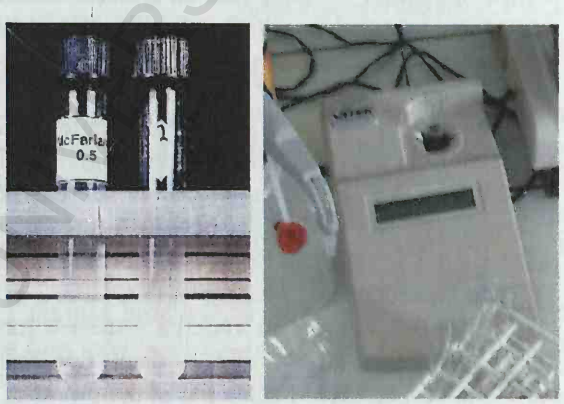


Fig. 369. Metoda nefelometrică (cu ajutorul standardului MacFarland) (stg.), respectiv densitometrică (dr.) de ajustare a densităţii inoculului microbian.

Inocularea plăcilor

Plăcile uscate sunt inoculate la cel mult 15 minute după prepararea inoculului. Se introduce un tampon steril în suspensia calibrată şi se retrage prin rotirea de mai multe ori, cu presiune contra peretelui tubului, pentru eliminarea excesului de lichid. Inocularea în plăcile cu agar Müller–Hinton se realizează prin tehnica însămânţării în pânză, prin rotirea plăcii cu câte 60°, căutând să obţinem o însămânţare uniformă (fig. 370).

În funcţie de specia testată, se vor alege antibioticele indicate de ultima ediţie a standardului CSLI, în care antibioticele sunt clasificate în mai multe categorii:

- *Grup A* – panelul de rutină;
- *Grup B* – antibiotice cu raportare selectivă (se testează atunci când tulpina izolată este R la antibioticele de clasa A, dacă pacientul este alergic la antibioticele din panelul de rutină sau nu tolerează antibioticele de clasă A, CGIII se testează pentru bacilii Gram negativi (BGN) izolaţi din LCR, trimetroprim sulfametoxazol (SXT) pentru tulpinile izolate din infecţii urinare, polimicrobiene, generalizate etc.);
- *Grup C* – antibiotice suplimentare/alternative (se testează pentru tulpinile R la antibioticele primare, cum sunt tulpinile nosocomiale care prezintă rate crescute de R, la pacienţii cu alergii, intoleranţă, cloramfenicolul pentru tulpinile de *Salmonella* extraintestinale etc.);
- *Grup O* – antibiotice care nu se testează în rutină, dar care sunt eficiente în infecţiile cu anumiţi agenţi patogeni;
- *Grup U* – nitrofurantoin, quinolone – se testează pentru tulpinile izolate din ITU;

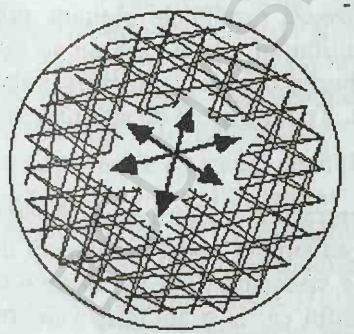


Fig. 370. Aspectul striurilor de însămânţare "în pânză", cu tamponul.

• *Inv* – antibiotice în curs de investigare, care nu sunt aprobate de FDA (*Food and Drug Administration*).

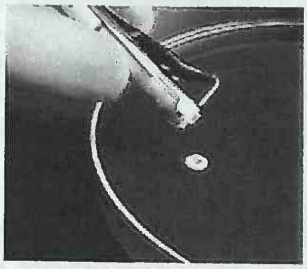


Fig. 371. Metode de depunere a discurilor de antibiotic pe placa cu mediu însămânțat (individual, cu ajutorul pensei sau simultan, cu ajutorul unui *dispenser*).

Discurile de antibiotic vor fi depuse cu ajutorul unor dispensere sau pense sterile, aplicându-se o presiune discretă pe discuri, pentru asigurarea contactului perfect cu suprafața agarului (fig. 371).

Discurile vor fi așezate la cel puțin 15 mm de marginea plăcii și distribuite în așa fel încât să nu existe suprapuneri între zonele de inhibiție.

După 15 minute de la depunerea disurilor, plăcile sunt introduse în termostatul de 35°C, răsturnate, cu mediul în partea superioară, în grupuri de maximum 5 plăci, și în aerobioză timp de 16–18 ore. În cazul stafilococilor sensibili la meticilină, incubarea se prelungește la 24 de ore pentru confirmarea absenței coloniilor rezistente la meticilină. După 18 ore (24 de ore în cazul testării sensibilității la meticilină și vancomicină) de incubare se măsoară cu o riglă diametrul zonelor de inhibiție, pe spatele plăcii. Citirea diametrului pentru meticilină se realizează cu ajutorul luminii transmise, pentru observarea coloniilor foarte mici, rezistente. În cazul apariției coloniilor rezistente în interiorul zonei de inhibiție, poate fi vorba de mutante rezistente, contaminare, populații heterogene sau culturi mixte.

Pentru controlul de calitate (CC) se utilizează tulpini standard pentru controlul reproductibilității și fiabilității metodologiei utilizate. Tulpinile standard pentru control se păstrează în congelator la –70°C pentru conservarea calităților și evitarea modificărilor genetice. Pentru reconstituire nu se decongelează, ci se scarifică suprafața tubului cu ansa sau cu tamponul și se însămânțează într-un mediu lichid. Se incubează la 35°C, timp de 18–20 ore, se realizează un nou pasaj și apoi se testează. Se utilizează tulpinile de control la fiecare lot nou de mediu sau de antibiotic. Tulpina *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 este folosită pentru detectarea nivelului inhibitorilor din mediul Müller–Hinton, în vederea testării trimetoprimului și/sau sulfametoxazolului. Tulpina ATCC 25923 este utilizată pentru CC al discurilor de antibiotice utilizate. Tulpina *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 servește pentru CC al conținutului cationic și al valorii pH a mediului, care pot influența în special rezultatele testării la aminoglicozide. Diametrele obținute cu tulpinile standard sunt comparate cu cele specificate în tabelele CLSI.

Testarea cantitativă a activității antimicrobiene – determinarea unor parametri cantitativi ai acțiunii antimicrobiene (CMI)

Tehnica microdiluțiilor binare în mediu lichid

Se realizează în mediu lichid (bulion Müller Hinton), repartizat în placi cu 96 de godeuri, în vederea determinării concentrației minime inhibitorii CMI. În acest scop, se realizează diluții seriale binare ale soluției stoc de antibiotic într-un anumit volum de mediu, ulterior godeurile fiind însămânțate cu suspensie microbiană cu densitate 0.5 MacFarland (1:5). La fiecare testare se lucrează cu martor de cultură microbiană (godeuri care conțin exclusiv mediu de cultură inoculat cu suspensie microbiană) și cu martor de sterilitate a mediului (godeuri care conțin exclusiv mediu de cultură).

După incubarea placilor la 37°C timp de 24 de ore, se analizează rezultatele obținute prin observare macroscopică. Concentrația de antibiotic corespunzătoare ultimului tub în care nu se mai observă dezvoltarea culturii reprezintă valoarea C.M.I. (μg/ml). În tuburile următoare, inclusiv tubul martor de creștere, mediul se tulbură ca urmare a creșterii microbiene. Tubul martor de sterilitate nu prezinta cultură dezvoltată.

Metoda E-test (Epsilometer test)

Metoda E-test utilizează benzi impregnate cu diferite concentrații ale aceluiași antibiotic, înscrise pe banda respectivă. Zona de inhibiție a creșterii microorganismului testat are aspect de elipsă, a cărei suprafață variază direct proporțional cu gradientul de concentrație a antibioticului difuzat în mediu, diminuându-se odată cu scăderea concentrației astfel că, la o anumită valoare, zona de inhibiție a creșterii va intersecta banda, concentrația înscrisă pe bandă la acest nivel indicând valorea C.M.I. (fig. 372).

Teste fenotipice pentru detectarea mecanismelor de rezistență la antibiotice

Metoda discurilor duble

Aceasta metodă presupune compararea diametrelor zonelor de inhibiție date de un disc impregnat cu un antibiotic betalactamic (penicilină, cefalosporină sau carbapenem) cu un alt disc impregnat cu același antibiotic asociat cu un inhibitor de betalactamaze (acidul clavulanic pentru betalactamaze sensibile la inhibitori și respectiv chelatori de metale bivalente, de exemplu EDTA, pentru metalo-betalactamaze). Dacă tulpina testată produce o enzimă sensibilă la acești inhibitori, diametrul zonei este mai mare pentru discul ce conține antibiotic + inhibitor.

Fig. 372. E-test ESBL (deformarea elipsei în zona centrală a benzii, datorită sinergismului de acțiune dintre cefalosporină-cefepim, PM) și inhibitorul de β-lactamază-cefepim cu acid clavulanic, PML).

Testul dublei difuzii pentru detectarea ESBL

Pe o placă cu mediu Müller-Hinton inoculată cu tulpina de testat (cultură de 24 h, însămânțare pe placă prin tehnica „în pânză") se aplică discuri cu amoxicilină/clavulanat (AMC) și la 25–30 mm distanță se plasează discuri conținând cefalosporine (ceftazidim, cefotaxim).

Se incubează peste noapte la 37°C.

Producerea de ESBL este certificată dacă diametrul zonei de inhibiție este extins din cauza clavulanatului (inhibitorul de β-lactamaze) (fig. 373a).

Avantajul acestei metode simple este costul scăzut; dezavantajul este acela că alegerea optimă a discurilor poate varia cu fiecare tulpină. Izolatele cu ESBL de tip TEM și SHV dau rezultate pozitive, în schimb cele cu enzime de tip CTX-M dau un rezultat pozitiv numai atunci când cefotaximul sau cefpodoximul înlocuiesc ceftazidimul, ca indicator de cefalosporine.

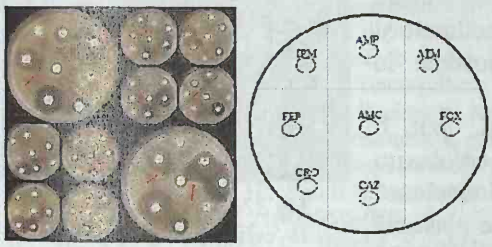


Fig. 373a. Fenotip ESBL, cu synergism între AMC și cefalosporină de generația a IV-a (cefepim)

Tulpinile producătoare de AmpC și majoritatea tulpinilor hiperproducătoare de enzime K1, dau rezultate negative, cu toate cele trei cefalosporine.

Se recomandă utilizarea discurilor de cloxacilină pentru detectarea penicilinazelor (acest antibiotic inhibă cefalosporinazele);

N.B. – inoculul dens poate masca hiperproducția de β-lactamaze;

N.B. – când sinergismul nu este vizibil din cauza fuzionării zonelor de inhibiție, se îndepărtează discurile (30 mm) sau se taie discurile de antibiotic în patru;

N.B. – existența unor discrepanțe mari între diametrul zonelor de inhibiție la CAZ și CTX se datorează prezenței unei alte enzime pe lângă ESBL (de exemplu β-lactamaze AmpC la *Enterobacter cloacae*).

Testul "treflei" sau Hodge modificat

Pune în evidență metaloß-lactomazele produse de bacilii Gram negativi non-fermentativi și de unele specii de enterobacterii. În acest scop, se însămânțează în pânză o tulpină de *K. pneumoniae* sau de *E. coli* sensibilă la carbapeneme. Se depune în centrul plăcii un disc de carbapenem (inipenem sau meropenem). Se însămânțează în striuri perpendiculare pe disc tulpinile de testat, posibil producătoare de metalo-ß-lactamaze. Apariția aspectului de treflă datorat inducerii zonei de inhibiție indică o tulpină producătoare de carbapenemază (în imagine, tulpinile B și D). Tulpinile sensibile nu determină modificarea aspectului circular al zonei de inhibiție a creșterii (tulpinile A și C) (Fig. 373b).

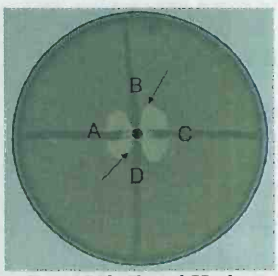


Fig. 373b. Testul Hodge (Arnold et. al., 2011).

Carbopenemazele pot fi evidențiate și prin E-Test (IMP/IMP+EDTA) sau prin adăugarea EDTA pe discul de IMP (creșterea zonei de inhibiție indică producerea de carbopenemază) (fig. 373c).

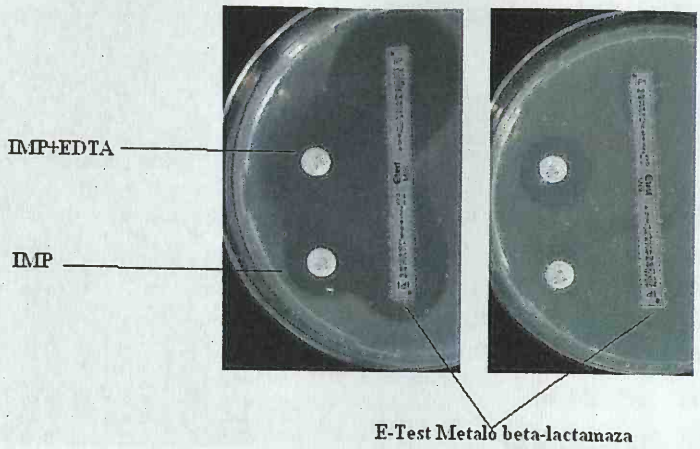


Fig. 373c. Evidenţierea producerii de MBL prin disc difuziune sau E-TEST

***Teste pentru confirmarea prezenţei unui mecanism de rezistenţă inductibil (β-lactamaze cromosomale inductibile* de tip AmpC sau fenotip MLSb inductibil)**

Cefalosporinele de generaţie I (ampicilina şi amoxicilina) induc exprimarea enzimelor tip AmpC şi sunt distruse de către acestea, la majoritatea speciilor de *Enterobacteriaceae*. Consecutiv, tulpinile bacteriene producătoare de β-lactamaze inductibile tip AmpC devin rezistente constitutiv. Unele tulpini aparţinând speciilor producătoare de β-lactamaze inductibile tip AmpC sunt mutante derepresate care produc enzime AmpC fără inducţie (derepresie stabilă). Aceste mutante sunt rezistente la aproape toate penicilinele şi cefalosporinele (Livermore şi colab., 2001) şi sunt frecvente în izolatele clnice (fig. 374).

Fig. 374. Fenotip de rezistenţă la cefalosporine şi AMC.

Speciile producătoare de β-lactamaze tip AmpC pot fi recunoscute prin teste de antagonism între cefoxitin şi cefotaxim (Sanders şi colab. 1982). Pentru efectuarea acestui test se inoculează plăci, conform protocolului din metoda antibiogramei, şi se plasează discuri cu ceftazidim şi cefoxitin, pe acceaşi placă, la o distanţă de 25 mm. Inducţia de β-lactamaze este evidenţiată prin aplatizarea zonei de inhibiţie a ceftazidimului în dreptul discului de cefoxitin. Astfel, cefoxitinul a determinat producerea de β-lactamaze inductibile care au hidrolizat ceftazidimul. Imipenemul este de asemenea inductor al cefalosporinazelor inductibile.

Acidul clavulanic este un inductor al β-lactamazelor tip AmpC şi de aceea apariţia unor mici colonii în interiorul zonei de inhibiţie a discului AMC poate fi un indicator util al prezenţei enzimelor de tip AmpC.

Fenomenul de antagonism între discul de eritromicină şi clindamicină poate indica prezenţa mecanismului de rezistenţă inductibilă la lincosamide si streptogramine, prezent la stafilococi şi pneumococi (fig. 372).

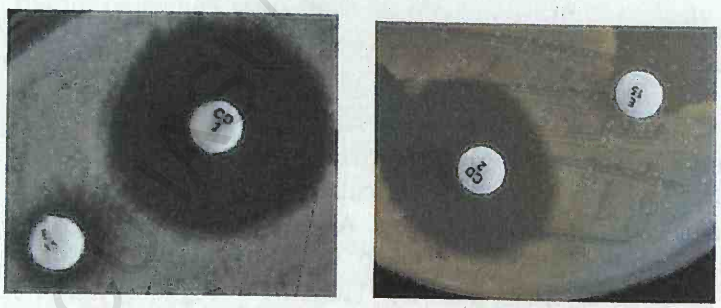


Fig. 375. Fenotip de rezistenţă la macrolide (eritromicină E) şi sensibilitate la lincosamide (clindamicină CD) – stg; fenotip de rezistenţă MLSBi – dreapta.

Au fost concepute numeroase teste directe de detectare a activităţii β-lactamazice, dar numai o parte se pretează ca analize de rutină. Majoritatea folosesc cefalosporine cromogene, sau corelează hidroliza penicilinei cu o schimbare a culorii mediului de reacţie, mediată de iod sau detectată cu un indicator de pH.

Testul la nitrocefin

Nitrocefinul este o cefalosporină care poate funcţiona ca substrat cromogen pentru β-lactamaze şi îşi schimbă culoarea de la galben la roşu atunci când este hidrolizat. Acesta reprezintă testul cel mai sensibil pentru majoritatea β-lactamazelor, exceptând penicilinazele stafilococice. Avantajul folosirii acestui antibiotic în testele de evidenţiere constă în faptul că el este hidrolizat de toate β-lactamazele cunoscute, indiferent de specificitatea acestora.

Nitrocefinul este disponibil sub formă de pudră purificată de la Becton Dickinson (Oxford, UK) sau de discuri îmbibate cu antibiotic (OXOID).

Coloniile bacteriene sunt raclate de pe mediul nutritiv solid şi resuspendate în tampon fosfat obţinându-se o suspensie densă, peste care se adaugă soluţie nitrocefin. Activitatea β-lactamazică este evidenţiată prin apariţia culorii roşii în 1–2 minute. În cazul enzimelor cu activitate mai mică răspunsul poate întârzia, însă rezultatele pozitive apărute la mai mult de 10 minute trebuie tratate cu scepticism întrucât ele pot fi cauzate de o activitate β-lactamazică secundară a proteinelor care leagă penicilina (*penicillin binding protein – PBP)* care formează complexe acil instabile (O'Callaghan şi colab., 1972).

Bibliografie

1. Ackermann, G., Tang Y. J., Kueper R., Heisig P., Rodloff A. C., Silva J. Jr., and Cohen S. H. 2001. Resistance to moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in *gyrA*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45:2348–2353.
2. Arnold R. S., Thom N. D., Sharma S., Phillips N., Jolinson J. K., Morgan D. J., 2011. Emergence of K. pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. South.Med.J. 104(1): 40-45.
3. Barry A. L., Jones R. N., Thornsberry C. 1981. Cefsulodin: antibacterial activity and tentative interpretive zone standards for the disk susceptibility test, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 20(4): 525–529.
4. Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J.S., Morse S.A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition http:// www.accessmedicine.com
5. Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. 1995 A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1211–1233
6. Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65(2): 232–260.
7. Courvalin P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin. Infect. Dis. 42(Suppl 1):S25–34.
8. Drlica K. 1999. Refining the fluoroquinolones. ASM. 65(6) 410-415.
9. Georgopapadakou N. H., Smith S. A., Sykes R. B. 1982. .Mode of action of azthreonam, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 21(6): 950–956.
10. Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition Jawetz, Melnick şi Adelberg. http:// www.accessmedicine.com
11. Livermore D. M. 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews. 8: 557–584.
12. Mihăescu G., Chifiriuc M. C., Dițu L. M. 2008. Antibiotice şi substanţe chimioterapeutice antimicrobiene. Ed. Acad. Române, Bucureşti ISBN 978-973-27-1573-4
13. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. 1999. Aminoglycosides: Activity and Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43: 727–37.
14. Musser J. M. 1995. Antimicrobial agents resistance in mycobacteria: molecular genetic insights, Clinical Microbiology Reviews. 1995, 8: 496–514.
15. O' Callaghan C. H., Morris A., Kirby S. M., Shingler A. H. 1972. Novel method for detection of P-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1:283–288.
16. Sanders C. C., Sanders W. E. Jr. 1986. Type I beta-lactamases of Gram negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics. J Infect. Dis. 154 :792–800
17. Shaw K. J., Rather P. N., Hare R. S., et al. 1993. Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. Microbiological Reviews 57:138–63.
18. Speer B. S., Shoemaker N. B., Salyers A. A. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance, Clinical Microbiology Reviews. 5(4): 387–399.
19. Taylor D. E., Courvalin P. 1988. Mechanisms of antibiotic resistance in Campylobacter species, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1988, 32(8): 1107–1112.
20. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Vol. I, II, Ed. Lesslie Collier, A. Balows, M. Sussman. 1998.
21. Vakulenko S. B., Donabedian S. M., Voskresenskiy A. M., Zervos M. J., Lerner S. A.,Chow J. W. 2003. Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(4): 1423–1426.
22. Vakulenko S. B., Mobashery S. 2003. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future, Clinical Microbiology Reviews. 16(3): 430–450.
23. Vester B., Douthwaite S. 2001. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(1): 1–12.
24. Wistreich A. G., Microbiology Laboratory Fundamentals and Applications (Hardcover), 1996.
25. Wolfson J. S., Hooper D. C. 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev.2: 378

PARTEA A II-A. VIROLOGIE MEDICALĂ

17. NOŢIUNI INTRODUCTIVE

Studiul virusurilor este mai palpitant decât un safari.

Virusurile[*] *sunt agenţi infecţioşi de natură nucleoproteică, care se disting net de sistemele biologice prin caracteristici unice structurale, biochimice şi funcţionale. Particularitatea structurală constă în organizarea de tip* acelular, *iar cea funcţională rezidă în faptul că virusurile se exprimă ca entităţi genetice numai în interrelaţiile cu sistemele biologice. Caracterele structurale şi funcţionale unice reies indirect şi din faptul că virusurile nu sunt incluse în nici unul dintre sistemele de clasificare a lumii vii.*

[*] Etimologic, denumirea de "virus" vine de la cuvântul grecesc "ios", al cărui sens este "otravă de natură biologică". Prin latinizarea acestui cuvânt a derivat noţiunea de "virus'.

Ştiinţa care se ocupă de studiul virusurilor se numeşte *Virologie.*

Primele cunoştiinţe ştiinţifice referitoare la virusuri datează de mai bine de un secol, însă preocupările de ordin practic pentru tratarea sau prevenirea unor maladii virale, datorită caracterului lor evident şi uneori foarte grav, sunt cunoscute din cele mai vechi timpuri. Incă din anii 2500 î. C., în China existau descrieri ale variolei umane, care se refereau atât la simptomatologia, cât şi la caracterul transmisibil al acestei maladii. Aristotel (484–322) afirma că rabia (turbarea) este transmisă prin muşcătura de câine.

Preocupările cu caracter strict aplicativ au devansat cu mult timp descoperirea propriu-zisă şi definirea pe plan conceptual a noţiunii de virus. Recunoscând că supravieţuitorii epidemiilor de variolă erau protejaţi de infecţiile ulterioare, chinezii au recurs la un procedeu empiric de vaccinare, prin inhalarea crustelor uscate din leziunile de variolă (variolizare). Variolizarea s-a practicat timp de secole, ca o metodă riscantă de prevenire a variolei. În 1796, Edward Jenner, după ce a suferit o infecţie variolică gravă la vârsta de 7 ani, ulterior, ca medic, a introdus vaccinarea *variolică*, sesizând că mulgătorii de vaci, care se infectează cu virusul *cowpox*, devin rezistenţi la infecţia cu virusul *variolei* (smallpox). L. Pasteur (1822–1895) a fundamentat ştiinţific practica producerii şi utilizării *vaccinului rabic*, fără să evidenţieze agentul infecţios. El presupunea că maladia este rezultatul infecţiei animalelor şi omului sănătos, cu un agent de dimensiuni foarte mici, cu particularităţi distincte, invizibil cu mijloacele optice ale timpului său şi care nu poate fi izolat prin metodele aplicabile altor agenţi patogeni.

În 1892, D. I. Ivanovski a arătat că *mozaicul tutunului*, ce se manifestă prin necroza unor zone ale frunzelor, este datorată unui agent transmisibil, invizibil la microscop şi care străbate filtrele ce reţin celulele bacteriene. Leziunile caracteristice sunt transmise în serie de la o plantă bolnavă, la cele sănătoase, prin filtratele de lichid acelular extras din frunzele infectate. In 1897, M. Beijerinck a confirmat filtrabilitatea acestui agent patogen, intuind natura sa deosebită şi l-a considerat ca fiind un agent "*contagium, vivum, fluidum*" (contagios, viu, fluid, adică trece prin filtrele care reţin bacteriile). A. Lwoff (1957) îl consideră pe Beijerinck ca fiind adevăratul *întemeietor al Virologiei* ca ştiinţă.

R. Dulbecco (1952) a cuantificat virusurile infecţioase pentru om şi animale, prin *testul plajelor de liză*. Preparatul viral diluat se foloseşte pentru a infecta monostratul celular, acoperit ulterior cu agar moale pentru a limita difuzia liberă a virionilor. Rezultatul este liza localizată a monostratului şi apariţia plajelor. Aceiaşi tehnică se foloseşte pentru izolarea virusurilor dintr-un amestec heterogen.

Capitolul de *virologie generală* își propune prezentarea particularităților moleculare ale structurii virionilor, diversitatea genetică și modalitățile de expresie a genomului viral, precum și mecanismele moleculare ale interacțiunii virus-celulă gazdă în diferitele sale variante: litică, persistentă sau oncogenă.

17.1. Modelul general de structură a virionului

Descrierile referitoare la anatomia virusurilor se referă totdeauna la *virion* – unitatea integrată de structură și funcție a tuturor virusurilor – dotată cu proprietatea de infecțiozitate a celulelor sensibile.

Din punct de vedere morfologic se disting următoarele tipuri de virioni (fig. 376):

1. Virioni de formă *sferică* (izodiametrică) sau sferoidală (de exemplu, virusurile gripale, adeno- și herpesvirusurile, picorna și reovirusurile etc.);
2. Virioni de formă *cilindrică* alungită, adică de bastonaș rigid sau flexibil (de exemplu, virusul mozaicului tutunului, fagii filamentoși);
3. Virioni de formă *paralelipipedică*, caracteristică poxvirusurilor (de exemplu, virusul vaccinal, virusul variolei etc.);
4. Virioni cu formă de *obuz* sau de cartuș, la rhabdovirusuri;
5. Virioni în formă de *cireașă cu coadă* (de exemplu, fagii cu coadă).

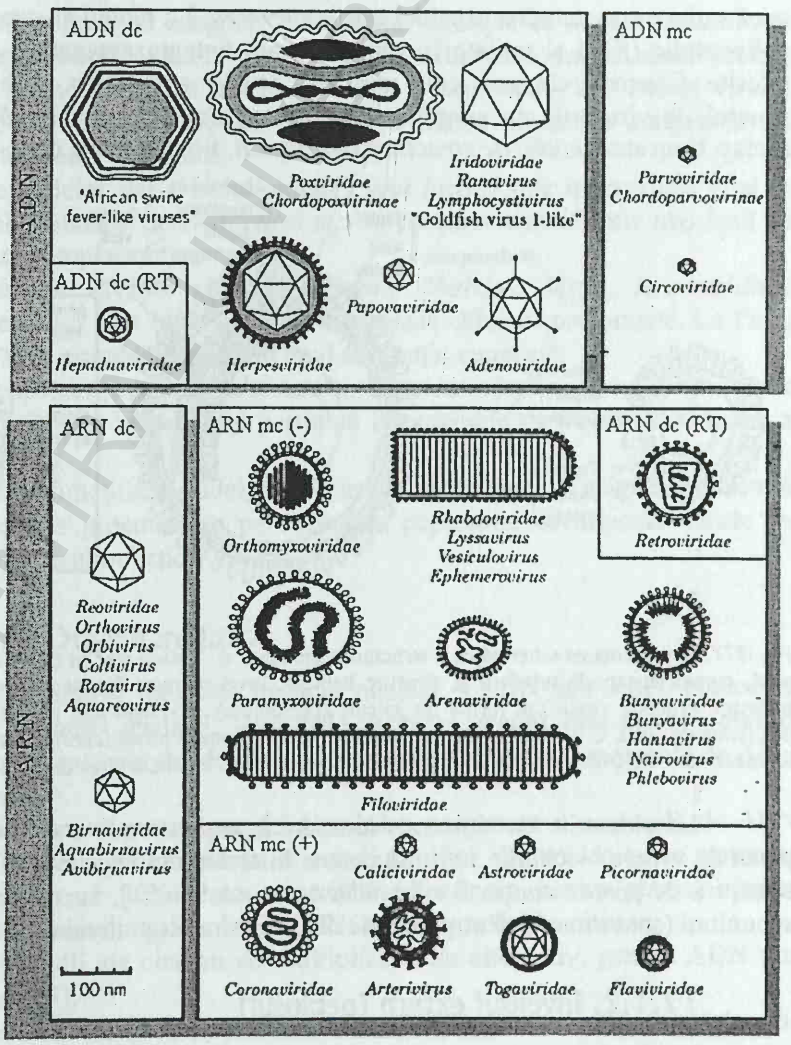


Fig. 376. Morfologia virionilor și natura genomului familiilor de virusuri infecțioase pentru om și animale (după Creighton, 1999).

Dimensiuni. Virusurile au dimensiuni submicroscopice. Cele mai mari sunt poxvirusurile, de 240–300 nm, adică apropiate de dimensiunile celor mai mici bacterii, la limita de rezoluție a

microscopiei optice. Bacteriofagii cei mai mari ating 200 nm. Cele mai mici sunt enterovirusurile, sub 30 nm diam., adică de dimensiunile ribosomilor (diam. de 25–30 nm).

Tehnicile de centrifugare analitică au făcut posibilă obținerea unor cantități mari de virus purificat. Organizarea internă a virionului și relațiile spațiale ale diferitelor componente structurale s-au evidențiat prin studii de difracție cu raze x a preparatelor virale în stare cristalină.

Virionii posedă doi constituienți structurali esențiali și definitorii: *genomul* și *capsida*. Virionii alcătuiți numai din genom și capsidă, cărora le lipsește învelișul extern, sunt caracteristici *virusurilor nude* (*Picorna-, Reo-, Adenovirus)*. La virusurile *învelite*, celor două componente obligatorii se adaugă o structură de suprafață, denumită *peplos sau înveliș extern*. Peplosul poartă pe suprafața sa subunități proeminente (peplomere), denumite *spicule*, care sunt structuri supramoleculare de glicoproteine virale.

Majoritatea virusurilor au o morfologie specifică, conferită de modul de așezare a capsomerelor în capsidă. Unele virusuri au o *capsidă helicală*, ce constă dintr-o înlănțuire a moleculelor proteice (capsomere), într-o catenă ce formează o spirală în jurul acidului nucleic. Alte virusuri au o *capsidă poliedrică*. Cel mai comun poliedru este *icozaedrul*.

Virusurile învelite au un aspect sferic, deși capsida lor poate fi icozaedrică.

17.1.1. Capsida

Capsida este o structură proteică ce acoperă genomul viral (*capsa*, lb. greacă = cutie). Cea mai mică unitate structurală a capsidei este *capsomera*. La rândul ei, capsomera este alcătuită dintr-un lanț polipeptidic (fiind și unitate biochimică) sau dintr-un agregat de catene polipeptidice identice sau diferite. Capsomerele sunt cele mai mici unități structurale vizibile la microscopul electronic. In general, la virusurile cu simetrie helicală, capsomerele sunt *unități morfologice* ale capsidei și în același timp sunt *unități de structură biochimică*, fiind formate dintr-un singur polipeptid (fig. 377).

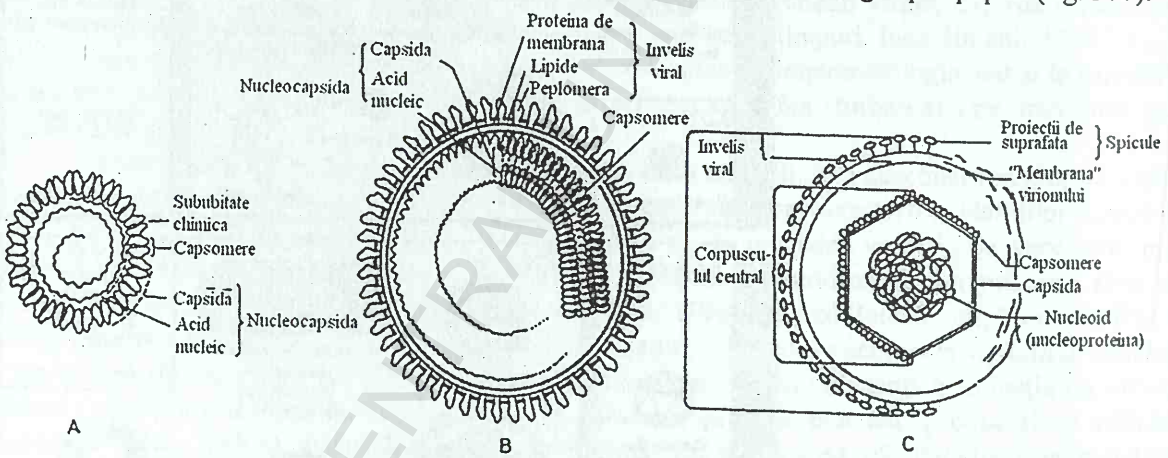


Fig. 377. Reprezentarea schematică a structurii virionului. A. Virion nud cu capsidă helicală. B. Virion acoperit de învelișul viral, cu nucleocapsidă tubulară și simetrie helicală. Învelișul este format dintr-un dublu strat fosfolipidic, în care sunt inclavate proteine virale sub formă de spicule (peplomere). Învelișul este tapetat la interior de o proteină de membrană codificată de virus. C. Virion icozaedric format dintr-o regiune centrală (*core*) în care se găsește genomul acoperit de capsida icozaedrică. Cele două componente formează nucleocapsida. Învelișul viral, prevăzut cu spicule, acoperă nucleocapsida.

La virusurile cu simetrie icozaedrică, capsomerele sunt numai unități morfologice, dar din punct de vedere biochimic sunt *oligomere*. In alcătuirea lor intră mai multe unități biochimice: cele cu structură de penton conțin 5 subunități (sunt pentamere), iar cele cu structură de hexon conțin trei subunitați (sunt trimere). Polipeptidele din structura oligomerului pot fi identice sau diferite.

17.1.2. Învelișul extern (peplosul)

Învelișul extern sau *peplosul* (*peplos*, lb. greacă = manta) este o structură accesorie care acoperă capsida unor virusuri. Peplosul este dobândit în timpul maturării virionilor prin procesul de *înmugurire* care, în general, are loc la suprafața celulei.

Peplosul viral întruneşte toate criteriile de structură trilaminară ale membranei celulei animale: stratul fosfolipidic dublu, în care sunt inclavate proteinele codificate de virus, dar şi proteine derivate din celulă. Fosfolipidele şi proteinele de origine celulară sunt diferite în funcţie de tipul de celulă în care a avut loc multiplicarea virală şi de sediul înmuguririi: prin membrana plasmatică (*Toga-, Rhabdo-, Para-, Orthomyxo, Retra-*), în reticulul endoplasmic (*Corona-, Flavi-*), în complexul Golgi (*Bunya-*). Virusurile herpetice se învelesc tranzitoriu pe membrana internă a nucleului, se dezvelesc la ieşirea din nucleu şi se reînvelesc în cisternele reticulului endoplasmic. Hepadnavirusurile au un înveliş de natură proteică, ce se asamblează la nivelul cisternelor de reticul endoplasmic.

Glicoproteinele codificate de virusuri sunt constituienţi universali ai peplosului, pe suprafaţa căruia proemină sub forma *spiculelor*. Diversitatea lor biochimică este foarte limitată (unul sau câteva tipuri pentru un virus). Glicoproteinele sunt formate dintr-un ax polipeptidic, la care se ataşează catenele laterale de *N-acetilglucozamină, manoză, fucoză, acid neuraminic*. Glicozilarea este catalizată de transferazele celulare, în timp ce proteina parcurge drumul de la locul sintezei, până la nivelul membranei. Greutatea lor moleculară este cuprinsă între 10 şi 100 kDa, iar conţinutul glucidic, între 5 şi 40%.

Glicoproteinele mediază interacţiunea virionului cu receptorii celulei sensibile şi favorizează fuziunea învelişului cu membrana celulei.

Glicoproteinele au rol important în procesul asamblării virale. Ele pot forma oligomeri şi interacţionează cu alte componente virale (capsida, proteina matriceală).

Unele virusuri învelite conţin proteine integrate, cu domenii multiple ce străbat peplosul, se oligo-merizează şi formează canale: proteina M_2 din învelişul virusului influenza formează canale ionice.

Retravirusurile încorporează neselectiv în înveliş, proteine membranare, dar alteori virusul recrutează selectiv proteine specifice celulei, care au rolul de a masca situsurile antigenice ale virionului şi de a evita astfel recunoaşterea imunitară.

Lipidele (sub forma glicolipidelor sau a fosfolipidelor) sunt încorporate în învelişul viral în timpul înmuguririi din membranele celulare. Învelişul viral are un conţinut semnificativ mai înalt de colesterol, comparativ cu membrana citoplasmatică.

Pentru majoritatea virusurilor învelite (*Herpes-, Toga-, Rhabdo-, Myxo, Retraviridae*), componentele moleculare ale învelişului sunt încorporate în membrane celulare preformate. La *Pox-, Iridovirus* şi lipofagi, învelişul viral se asamblează într-un mod mai puţin cunoscut.

Semnificaţia biologică a capsidei şi a învelişului extern. Capsida îndeplineşte un rol protector esenţial pentru genomul viral, acoperindu-l integral şi participă la procesele de adsorbţie şi fixare a virionului pe suprafaţa celulei sensibile.

Învelişul extern consolidează funcţiile capsidei, protejează nucleocapsida şi asigură o structură mai compactă a virionului. Spiculele proeminente pe suprafaţa peplosului favorizează fazele de adsorbţie şi fixare a virionului în procesul infecţios.

17.1.3. Genomul viral. Organizare fizică

Genomul viral este alcătuit dintr-o moleculă de acid nucleic – ADN sau ARN. Niciodată virionii nu conţin ambele tipuri de acizi nucleici. Virusurile al căror genom este alcătuit dintr-o moleculă de ADN aparţin grupului *dezoxiribovirusuri*, iar cele care au ca genom o moleculă de ARN formează grupul larg al *ribovirusurilor*.

Majoritatea virusurilor infecţioase pentru om şi animale au ca genom o moleculă de ARN monocatenar de polaritate *pozitivă* sau *negativă*. Numai membrii familiei *Reoviridae* au ca genom o moleculă de ARN dublu catenar. Peste 90% dintre virusurile infecţioase pentru plante, aparţin *ribovirusurilor*, genomul lor fiind alcătuit dintr-o moleculă ARN mono- sau dublu catenar.

Unele virusuri, în diferite stadii ale ciclului de multiplicare, au alternativ, genom ADN sau ARN (retra-, hepadna, caulimovirusuri).

Genomul viral poate avea o structură *unitară* sau informaţia genetică este distribuită în *mai multe segmente genomice* legate prin interacţiuni specifice.

Moleculele de acid nucleic viral pot fi *monocatenare* sau *dublu catenare, lineare* sau *circulare*. Faptul că genomul unor virusuri este format dintr-o singură catenă de ADN, s-a dedus din

observația că determinările cantitative ale *adeninei* nu sunt echivalente cu ale *timinei*, iar cantitatea de *guanină* nu este egală cu cea de *citozină*.

În funcție de structura moleculară a materialului genetic, virusurile cu genom ADN se împart în trei clase:

– virusuri cu genom dublu catenar, linear (adeno, herpes etc.);
– virusuri cu genom dublu catenar, circular (papova);
– virusuri cu genom monocatenar, linear (parvovirusuri).

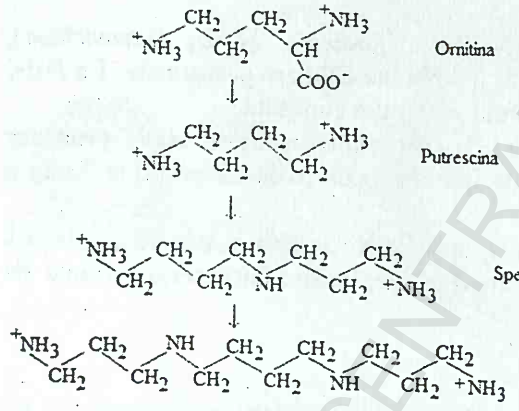
Toate moleculele genomice ADN lineare dublu catenare au secvențe repetate invers, numai la extremități (adeno-) sau, atât la extremități, cât și în interior.

Moleculele genomice *monocatenare*, lineare (parvovirusuri) sau circulare (fagul φx 174), au o tendință foarte accentuată de a se plia, formând bucle dublu catenare în ac de păr, ori de câte ori secvențele de baze permit formarea unui număr semnificativ de perechi, reunite prin intermediul punților de H. Circa jumătate din bazele de ADN monocatenar sunt legate prin punți de H, astfel încât molecula este foarte *compactă*. Odată cu formarea parțială a unei catene duble, molecula se pliază. Starea pliată este favorabilă unei împachetări optime, deoarece permite o stivuire mai eficientă a suprafețelor hidrofobe ale bazelor.

Genomul viral *dublu catenar*, din punct de vedere topologic (al configurației spațiale), poate fi *linear* cu extremități libere (adeno, herpes) sau cu *extremitățile legate covalent* prin punți fosfodiesterice (poxvirusuri), *circular închis* (papovavirusuri), cu diferite grade de supraspiralizare și corespunzător, cu un grad mai mare sau mai mic de condensare.

La fagul λ, genomul este dublu catenar linear, cu cozi monocatenare complementare adezive la cele două capete 5'(sticky ends).

Genomul viral are sarcină netă negativă (este polianionic) și este asociat cu două tipuri de molecule care favorizează plierea (condensarea) și împachetarea: *poliamine* (oligocationice) și *proteine (policationice)*. Dintre poliamine, spermina și spermidina s-au identificat în vironii mixo-, herpes-, adeno-, poxvirusurilor, iar la fagul T_4 – putrescina și spermidina.



– *Poliaminele.* În prima treaptă a sintezei poliaminelor, din ornitină, ornitin-decarboxilaza (ODC) generează *putrescina.* Sinteza celorlalte poliamine este catalizată de S-adenozil-metionin-decarboxilază, spermidin-sintetază și respectiv spermin-sintetază. Poliaminele sunt ubicvitare în toate celulele, fiind necesare pentru creștere și diferențiere. Expresia crescută a ODC sau inducerea biosintezei sub acțiunea unor stimuli ai creșterii celulei eucariote, produce transformarea celulei. Inhibitorii ODC stopează creșterea celulară și sunt studiați pentru potențialul antineoplazic și ca agenți antimicrobieni.

Efectul de împachetare este favorizat de legăturile ionice între grupările *cationice* ale poliaminelor și proteinelor și de grupările *polianionice* ale acizilor nucleici.

Proteinele asociate genomului sunt *bazice* de tipul *protaminelor* și *histonelor* și sunt cunoscute sub denumirea generică de *nucleoproteine*. Unele proteine asociate genomului sunt ARN-polimeraze.

La unele virusuri ADN, la capătul 5' al fiecărei catene este asociată o *proteină*, care-i conferă stabilitate, dar are și rol în inițierea replicării genomului. Genomul viral și proteinele asociate formează *regiunea centrală*, electronodensă a virionului.

În mediul celular, după ce genomul viral este eliberat, poliaminele se disociază de ADN și cromosomul viral se relaxează, cu extinderea catenelor genomice, modificări conformaționale care favorizează procesele de replicare și transcriere în celula infectată.

Dimensiunile genomului ribovirusurilor sunt relativ uniforme, variațiile fiind în limita a 30 de ori: genomul *virusului hepatitei delta* are gr. mol. de 500 kDa (1678 nucleotide). Virusul hepatitei delta are cel mai mic genom și în ciclul multiplicării este dependent de virusul hepatitei B. Cel mai mare genom ARN este acela al *reovirusurilor* (15.000 kDa).

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Genomul dezoxiribovirusurilor are o scară de variație dimensională mai largă, de la 1 la 185. Cele mai multe virusuri ADN au genom mic (cel mai mic genom este al *virusului hepatitei B* – 1000 kDa* = 3.200 nucleotide), dar unele virusuri au un genom asemănător cu al celulelor: fagi, phycodnavirus, mimivirus, poxvirus) infecțioase pentru bacterii, alge, nevertebrate și respectiv, vertebrate). *Mimivirus* are un genom de 1,2 megabaze ($1,2 \times 10^6$), mai mare decât al bacteriilor mici.

* Un Dalton este egal cu masa atomului de hidrogen, adică $1,672649 \times 10^{-24}$ g. 1 kDa =1 000 D.

Uneori, virionii unui preparat prezintă variații ale cantității de ARN genomic. De exemplu, la paramixovirusuri, un virion poate să conțină mai multe copii ale genomului viral. Alteori, particulele virale pot fi goale (lipsite de genom), sau includ numai un fragment genomic. Din genom lipsesc diferite secvențe genice, uneori chiar cele care condiționează multiplicarea virală. Aceștia sunt virioni defectivi și în ciclul multiplicării sunt dependenți de prezența în celulă, a unor virusuri "helper" (ajutătoare), care suplinesc defectele genetice ale virionilor defectivi.

17.1.4. Genomuri virale ARN segmentate (divizate, multipartite)

Unele ribovirusuri, infecțioase pentru organismul animal, precum și altele infecțioase pentru plante au genomul alcătuit din mai multe segmente. Ribovirusurile cu genom segmentat, infecțioase pentru om și animale (virusurile gripale, reo- și arenavirusurile) se caracterizează prin faptul că toate segmentele genomului sunt încorporate într-o capsidă comună.

Virusurile gripale au genomul alcătuit din 8 și respectiv 7 segmente de ARN monocatenar. La *Arenaviridae*, genomul este format din două segmente inegale (L = *L*arge = 2×10^6 D și S = *S*mall = 10^6 D). La reovirusuri, genomul are caracter de unicitate, fiind format din l0 segmente de ARN dublu catenare. La toate cele trei familii de virusuri, segmentele de ARN sunt *distincte*, adică se deosebesc prin secvența nucleotidelor și nu provin prin fragmentarea unei molecule mari. Dovada caracterului lor distinct este că moleculele nu hibridează unele cu altele, fiecare este transcrisă în ARNm specific și codifică sinteza unei proteine specifice.

Ribovirusurile cu genom segmentat, infecțioase pentru plante (*Tobra-*, *Bromo-*, *Como-*, *Nepo-*, *Cucumovirus*) au o particularitate distinctă: segmentele genomului lor nu sunt încorporate în aceiași capsidă virală, ci sunt distribuite individual în capside separate. Pentru desfășurarea ciclului de multiplicare virală este necesară infecția simultană cu toate particulele virale care constituie complementul genomic. Virusul mozaicului lucernei (alfalfavirus) are genomul alcătuit din 5 segmente, repartizate în 4 tipuri de virioni: trei au formă de bastonaș, fiecare având câte o moleculă de ARN, iar al IV-lea, de formă elipsoidală conține două segmente de ARN.

Avantajul genomului segmentat constă în aceea că mesajele genetice mai mici sunt mai ușor replicate și transmise în celula eucariotă animală sau vegetală. Pentru virusurile cu genom segmentat repartizat în mai multe capside, faptul pare dezavantajos pentru inițierea multiplicării, dependentă de toate segmentele genomice încapsidate separat, dar în realitate, în procesul infecțios se eliberează cantități imense de particule virale, care asigură șansa transmiterii tuturor particulelor ce conțin un complement genomic.

17.1.5. Modalități particulare de codificare a informației genetice la virusuri

Virusurile prezintă o diversitate proprie de *sisteme genetice*, neîntâlnită la sistemele celulare bacterii, fungi plante și animale, luate la un loc). Diversitatea genetică a virusurilor este consecința succesului lor de a parazita toate grupele cunoscute de organisme.

Raportul dintre gr. mol. a genomului și a produsului de sinteză este de circa 10/l pentru genomul mono-catenar și 20/l pentru cel dublu-catenar. Valoarea foarte mică a acestui raport se datorează existenței unor mecanisme moleculare care permit utilizarea cu maximă eficiență a informației genetice conținută în genom.

Datorită dimensiunilor mici ale genomului lor, virusurile fac economie de informație genetică, utilizând mai multe *strategii de codificare*. Noțiunea de "strategie" semnifică modalitățile de organizare și funcționare a informației genetice care permit utilizarea informației genetice cu randament optim.

1. Virusurile codifică sinteza unei varietăți foarte limitate de proteine. Capsida este formată din molecule proteice de același tip, sau dintr-un număr mic de tipuri de proteine diferite, la care se adaugă alte câteva tipuri de proteine asociate genomului. Asociate peplosului, se găsește un număr restrâns de glicoproteine.

2. Pentru realizarea unor funcții proprii, unele virusuri utilizează molecule ce aparțin total sau parțial celulei gazdă: de exemplu, enzima de replicare (ARN-polimeraza) a fagului Q-β (un fag ARN) este alcătuită din 4 subunități polipeptidice, dintre care una este codificată de virus, iar celelalte trei aparțin celulei.

3. Unele polipeptide virale îndeplinesc funcții multiple, având atât rol *structural* (adică sunt proteine care intră în alcătuirea virionului), cât și rol *reglator*.

4. În ciclul de multiplicare, unele virusuri utilizează informația genetică a virusurilor *helper*, care suplinesc anumite deficiențe de multiplicare ale virusului defectiv. Virusurile defective nu se pot multiplica până la stadiul de virus matur, deoarece le lipsesc genele codificatoare ale proteinelor structurale sau genele reglatoare ale morfogenezei. De exemplu, adenovirusurile au funcția de helper pentru multiplicarea unor parvovirusuri (*A*deno-*A*ssociated-*V*iruses – *AAV*), iar virusul hepatitei B are rol helper pentru multiplicarea virusului δ.

5. Virusurile utilizează mai multe modalități de transmitere a informației genetice de la genom la proteine, prin intermediul ARNm. Ele depășesc condițiile restrictive ale cantității limitate de informație genetică, impusă de dimensiunile reduse ale capsidei, prin existența *genelor suprapuse*. Suprapunerea genică semnifică faptul că o secvență de ADN poate să codifice mai mult decât o proteină. Fenomenul suprapunerii se realizează pe două căi.

1) *Înnădirea aceloraşi secvențe codificatoare ale moleculei de ARNm în succesiuni diferite.* Virusurile infecțioase pentru organismele eucariote, au informație genetică *discontinuă*, așa cum este și a celulelor gazdă. Fenomenul de *înnădire* (splicing) a secvențelor informaționale neadiacente de acid nucleic s-a identificat inițial la adenovirusuri* (Berget, 1977), dar acum este recunoscut ca fiind universal și are loc fie în timpul sintezei ARNm sau, în genomul eucariot, ca rezultat al rearanjării genelor prin fenomene de transpoziție în timpul diferențierii celulare.

* În celulele infectate cu adenovirusuri, moleculele de ARN care hibridează cu ADN viral sunt heterogene ca dimensiuni: aceleași sonde de ADN hibridează cu molecule lungi și cu molecule scurte de ARN. S-a dedus astfel, că genomul viral este transcris în molecule lungi, clivate ulterior în fragmente mai mici și reunite în molecule de ARNm de lungimi diferite (clivare-joncțiune = sudare). S-a precizat pentru prima dată că gena este discontinuă: are fragmente necodificatoare care alternează cu cele codificatoare. Apoi s-a constatat că discontinuitatea este o caracteristică generală a genelor celulei eucariote.

Genele adenovirale introno-exonice sunt transcrise de ARN-pol II în precursori ARNm. Precursorii sunt supuși proceselor de prelucrare și maturare, în care secvențele intronice sunt eliminate și degradate. Clivajul are loc totdeauna la aceleași secvențe semnal, dar joncțiunea reunește un număr *variabil* de secvențe codificatoare și în *succesiune alternativă*, astfel încât o genă (E1A) codifică cel puțin 8 proteine diferite. Reacțiile de trans-esterificare și legare a exonilor sunt catalizate de ansambluri alcătuite din 5 particule *ribonucleoproteice nucleare mici* (snRNP) denumite *spliceosomi*. Fiecare snRNP constă dintr-o moleculă mică de ARN și proteine, unice sau comune diferitelor snRNP.

ARNm este rezultatul unui proces de prelucrare* a copiei primare (ARN premesager = ARNpm), ce constă în eliminarea intronilor și înnădirea exonilor. La virusuri, exonii sunt sudați în *succesiuni diferite* în molecula de ARNm, ceea ce diversifică gama proteinelor codificate de o secvență de ADN. Secvențele intronilor nu se găsesc în ARNm matur.

* În timpul transcrierii ARN pm nascent este împachetat cu proteinele și formează particule RNP, în care copia este prelucrată și cu care rămâne asociată până când este exportată în citoplasmă.

Proteinele care se asociază cu ARNpm nascent au rol dublu:

1. conferă protecție anti-degradativă;
2. este chiar aparatul de prelucrare a ARNpm.

Prelucrarea ARNpm este un proces complex care începe chiar în timpul transcrierii și constă într-o succesiune de evenimente: bonetare, clivarea-înnădirea exonilor, poliadenilarea capătului 3', ARN-editing și exportul din nucleu.

Bonetarea ARNm constă în adăugarea *7-metil-G* la capătul 5' și se face imediat după transcriere, fiind necesară pentru înnădire, exportul nuclear, stabilitate și traducere.

Eliminarea secvențelor genice necodificatoare se face pe 2 căi:

– intronii *nu sunt transcriși*, deoarece ARN-polimeraza sare de la un exon la altul și ignoră intronii;

– intronii sunt transcrişi şi rezultă o copie primară (ARN-premesager), care este *clivată* pentru eliminarea intronilor, iar exonii sunt înnădiţi. Secţionarea intronilor şi înnădirea exonilor este rezultatul acţiunii unui aparat enzimatic, denumit *spliceosom*, format din multe proteine grupate în *particule RNP nucleare heterogene* (hnRNP). Complexul spliceosom recunoaşte secvenţa de clivare GU-intron-AG exon ce delimitează intronul şi îl excizează din ARNpm. Excizia intronilor este strâns asociată în timp cu etapa *înnădirii* (splicing) exonilor.

Unele molecule de ARNm se înnădesc singure, pentru că moleculele de ARN au activitate *ribozimică* şi intronii se elimină fără intervenţia aparatului enzimatic al spliceosom-ului. Reacţia nu este pur enzimatică, deoarece ARN însuşi se modifică. Se consideră că o enzimă adevărată rămâne nemodificată la sfârşitul reacţiei.

Genele histonei sunt excepţia pentru că nu conţin introni şi ARNm nu necesită clivare şi înnădire.

Capătul 3' al ARN este *poli-adenilat*. Secvenţa de clivare şi inserţie a poli-A este localizată în regiunea 3' netradusă, ce urmează codonului stop al traducerii. Polimeraza adaugă secvenţa poli-A de 100–200 de resturi la capătul 3'. Proteinele specifice ce se asociază cu poli-A îi măresc stabilitatea şi uşurează exportul nuclear şi traducerea ARNm matur.

Exportul nucleo-citoplasmatic al ARNm necesită interacţiunea cu proteine chaperoni, dintre care unele conţin semnale de export. ARNt şi ARNr nu sunt bonetate şi exportul lor nu necesită interacţiunea cu proteine specifice.

În citoplasmă, capătul 5' bonetat este recunoscut de factorul de iniţiere IF-4E, ce recrutează alte proteine şi formează un complex funcţional ce se asociază cu subunitatea 40S. Ansamblul alunecă pe ARNm până la codonul de iniţiere, unde leagă subunitatea 60S şi este iniţiată traducerea.

Echipamentul enzimatic care catalizează prelucrarea ARNm prin clivare şi înnădire este localizat în nucleu şi în consecinţă, mecanismul înnădirii genice poate fi activ numai la virusurile care au o fază nucleară a ciclului de multiplicare (adeno, herpes, papova, influenza).

2) *Iniţierea traducerii mesajului la două sau chiar trei situsuri diferite.* Unele virusuri *schimbă cadrul de citire a informaţiei în timpul traducerii* (frame shifting), iniţiind sinteza proteică la noi situsuri de traducere a ARNm (open reading frames – ORF). Prin iniţierea traducerii mesajului la două sau chiar trei situsuri diferite, aceiaşi secvenţă de nucleotide este tradusă în două sau trei proteine distincte.

Ribosomii au capacitatea intrinsecă de a schimba cadrul de citire în timpul traducerii mesajului, pe care unele virusuri o exploatează pentru a diversifica setul de proteine pe care le sintetizează. S-a sugerat că subunitatea 40S a primului ribosom angajat în traducerea ARNm se fixează la ***primul codon de iniţiere*** a traducerii (AUG). Restul ribosomilor alunecă pe molecula de ARNm, până la următoarea tripletă de iniţiere AUG, de unde reîncepe traducerea mesajului. De exemplu, în timpul traducerii mesajului pentru proteina *gag* a virusului sarcomului Rous, 5% din ribosomi îşi schimbă cadrul de citire pentru a sintetiza proteina *gag-pol*. Secvenţe specifice ale ARNm viral favorizează alunecarea ribosomilor, astfel încât se sintetizează şi mici cantităţi de revers-transcriptază (RT).

Schimbarea cadrului de citire poate fi rezultatul 'ARN editing', proces ce semnifică modificări specifice ale secvenţei de nucleotide şi constă în inserţia sau deleţia unei baze.

În ciuda diversităţii strategiilor funcţionale ale genomului viral, universalitatea codului genetic nu este încălcată, deşi anumiţi codoni pot avea o frecvenţă superioară.

Gene neesenţiale. Calificativul de "genă neesenţială" a genomului viral este complicat de faptul că un produs genic poate fi esenţial în anumite condiţii de mediu celular şi nesemnificativ în altele. De exemplu, gena Tk de HSV 1 nu este esenţială pentru multiplicarea virusului în celule care cresc şi se divid cu o rată crescută, dar este esenţială pentru replicarea genomului în celulele care nu se divid (neuroni). Gena Tk permite ca timidina exogenă să fie încorporată în ADN. Dependenţa virusului de produsul genei proprii depinde de nivelul activităţii enzimei în celula gazdă.

Un alt exemplu al unei gene neesenţiale este cea care codifică glicoproteina E_3 (de la adenovirusuri). Gena poate fi inactivată prin mutaţie şi ciclul de multiplicare virală nu este influenţat. Virusul mutant, *in vivo*, este mai puţin virulent decât virusul de tip sălbatic, iar leziunile tisulare sunt diminuate.

Glicoproteina E_3 este activă la nivelul reticulului endoplasmic şi stopează transportul moleculelor CMH I pe suprafaţa celulei infectate, astfel încât celulele Tc nu răspund eficient faţă de celulele infectate cu virusul de tip sălbatic. Se formează mai mult virus progen, iar patologia tisulară este mai amplă.

17.1.6. Infecţiozitatea acizilor nucleici virali

Desfăşurarea ciclului de multiplicare virală nu este condiţionată de ansamblul integrat al componentelor structurale ale virionului, ci în esenţă, numai de genomul viral şi uneori, de proteinele de replicare asociate acestuia. Infecţiozitatea acizilor nucleici virali s-a demonstrat iniţial pentru ADN fagic şi ulterior pentru ARN al VMT. Dacă acidul nucleic genomic funcţionează ca ARNm, infecţiozitatea sa este o proprietate fără excepţie. ARN genomic cu polaritate negativă, în stare pură, nu este infecţios, deoarece este necesară transcrierea sa într-o copie de ARN complementar, cu rol de ARNm.

Infecţiozitatea acizilor nucleici virali nu mai este condiţionată de interacţiunea cu receptorii suprafeţei celulare. De aceea, spectrul celulelor infectate prin intermediul acizilor nucleici purificaţi creşte foarte mult, dar eficienţa procesului infecţios (numărul de molecule genomice infecţioase/celulă şi respectiv cantitatea de virus progen) diminuează semnificativ.

Importanţa geneticii virale. Studiile de genetică virală au adus o contribuţie de o valoare deosebită la definirea unor noţiuni fundamentale. Analiza modului în care este codificată şi transmisă informaţia genetică, la virusurile infecţioase pentru celula animală a dat o definiţie mai flexibilă noţiunii de *genă*, ca rezultat al descoperirii că aceiaşi secvenţă de ADN sau ARN poate să specifice (să codifice) mai mult decât un produs genic. Conceptul vechi, "o genă = o enzimă" a fost înlocuit cu definiţia mai corectă, "o genă poate să codifice mai multe polipeptide". Datorită suprapunerii genice, fenomen descoperit la virusuri, genomul nu mai poate fi considerat ca o succesiune lineară de unităţi codificatoare independente.

Descoperirea caracterului discontinuu al informaţiei genetice este de asemenea, rezultatul studiului genetic al virusurilor infecţioase pentru celula umană şi animală.

Una dintre marile contribuţii ale virologiei animale la dezvoltarea ştiinţelor biologice în general şi a biologiei moleculare în special, a fost descoperirea şi caracterizarea *enzimei revers-transcriptază* a retravirusurilor. Pentru prima dată a devenit evident că transferul informaţiei genetice în sistemele biologice nu se face exclusiv pe filiera ADN --- ARN --- proteine, ci în anumite situaţii, informaţia genetică poate fi transmisă în sensul ARN --- ADN --- ARN ---- proteine. A fost astfel completată *axioma centrală a biologiei moleculare*, care susţinea transmiterea unidirecţională a informaţiei genetice.

Pe de altă parte, enzima revers-transcriptază a devenit unul dintre instrumentele foarte importante ale biotehnologiilor bazate pe clonare şi secvenţiere. S-a lărgit cadrul de aplicare a metodologiei ingineriei genice. A devenit posibilă propagarea copiilor ADN ale genomului viral ARN, precum şi a copiilor ADN obţinute prin reverstranscrierea ARNm celular.

Informaţia genetică virală conţine determinanţi genetici care asigură desfăşurarea ciclului de multiplicare, în celula gazdă sensibilă: replicarea genomului, informaţia genetică necesară devierii metabolismului celulei gazdă, în sensul sintezei componentelor virale, genele pentru sinteza proteinelor structurale şi reglatoare, precum şi genele care asigură asamblarea şi eliberarea virionilor progeni din celula gazdă.

Genomul viral condiţionează patogenitatea şi virulenţa virală şi asigură potenţialul de variabilitate a virusurilor. Variabilitatea este o proprietate esenţială pentru propagarea virusurilor în natură. Astfel, spiculele de hemaglutinină ale virusului gripal prezintă o variaţie biochimică de la un sezon la altul, iar spiculele virusului imunodeficienţei umane (HIV), cu rolul de a fixa virionul pe receptorii membranari ai limfocitului TCD_4, au tendinţa spre o variaţie biochimică accentuată.

17.2. Definirea conceptului modern de virus

Noţiunea de virus a fost definită în cadrul conceptual actual de către A. Lwoff, pe baza stabilirii unor deosebiri distincte între "virus" şi "nevirus". Ca o consecinţă a unui mare număr de caractere discriminatorii faţă de sfera viului (care semnifică existenţa unor deosebiri absolute) pe care le posedă în comun, s-a conchis ca virusurile formează un grup particular de agenţi infecţioşi, reuniţi într-o categorie unică, distinctă de lumea vie, faţă de care asemănările şi afinităţile sunt minime, iar diferenţele şi deosebirile sunt fundamentale (tabelul 67).

Tabelul 67.

Caracterele discriminatorii dintre virusuri şi bacterii.

Caracter	*Virusuri*	*Bacterii*
Unitatea structurală	Virionul	Celula bacteriană
Stările posibile de existenţă	*Virionul* sau virusul infecţios matur (particula virală infecţioasă). *Virus vegetativ*, adică genomul viral liber în celula infectată, care poate fi replicat. *Provirus* = genomul viral integrat în cromosomul celulei gazdă.	*Celula* bacteriană (forma vegetativă), capabilă de diviziune. *Sporul* bacterian (forma facultativă de diferenţiere).
Structura internă	Genomul viral şi capsida, structuri esenţiale şi obligatorii, formează împreună *nucleocapsida*. *Învelişul extern (peplosul)*, cu spicule hemaglutinante este o structură caracteristică numai virusurilor învelite.	Relativ complexă (structuri esenţiale şi accesorii): perete celular, membrana plasmatică, citoplasmă, nucleoid, ribosomi, vacuole, incluzii, spor, aparat fotosintetic, capsulă, flageli, pili, fimbrii.
Simetria la nivel molecular	Constantă, de tip helical, icozaedric sau binară (mixtă).	Absentă
Acizi nucleici	ADN sau ARN, niciodată ambii, cu localizare exclusivă în genomul viral.	ADN, în cromosom şi plasmide. ARN, ca ARNm, ARNt şi ARNr, în citoplasmă.
Proteine	Fiecare gen de virus are un număr fix de molecule proteice de acelaşi tip (identice) sau aparţinând unui număr mic de tipuri diferite. Proteinele virale au rol structural (intră în alcătuirea capsidei) şi uneori au rol enzimatic (sunt proteine de replicare a genomului).	Număr mare de molecule, ce aparţin la 2–3.000 de tipuri diferite, cu rol structural şi funcţional.
Glucide	De regulă sunt absente. Se găsesc în peplosul viral sub forma glicoproteinelor şi sinteza lor este catalizată de glicozil-transferazele celulare.	Prezente în mod constant
Lipide	De regulă sunt absente. Se găsesc în peplos şi provin din membrana celulară la nivelul căreia are loc învelirea virionului.	Prezente constant
Echipamentul enzimatic de biosinteză şi de catabolism.	Absent. Uneori virionul conţine enzime cu rol de replicare sau enzime care favorizează pătrunderea virionului sau eliberarea sa din celulă. Lipsesc enzimele de biosinteză sau cele producătoare de energie.	Prezent constant
Capacitatea de sinteză a moleculelor cu potenţial energetic ridicat.	Absentă	Prezentă constant
Capacitatea de sinteză independentă a constituienţilor chimici.	Absentă	Prezentă
Capacitatea de creştere.	Absentă	Prezentă constant
Capacitatea de diviziune.	Absentă	Prezentă constant
Dependenţa de substratul viu pentru multiplicare.	Se multiplică exclusiv în substratul celular viu, pornind uneori numai de la genom, iar alteori de la genom şi de la enzimele de replicare.	Multiplicarea celor parazite este independentă de substratul viu, cu excepţia rickettsiilor, chlamidiilor, *Buchnera** şi *Bdellovibrio* şi porneşte totdeauna de la ansamblul integrat al constituienţilor celulari, chiar pentru cele dependente de substratul viu. Ele au degenerat până la punctul de a necesita energie furnizată de celula gazdă, dar se deosebesc de virusuri.
Utilizarea sistemelor structurale şi biochimice ale gazdei în cursul parazitismului intracelular: – sistemul enzimatic Lipmann** –ARNt – ribosomii	Totdeauna	Bacteriile parazite –niciodată.
Tipul de parazitism	Parazitism absolut	Cel mult obligat parazite
Tipul de organizare	Acelular	Celular.

* *Buchnera* trăieşte numai în interiorul celulei eucariote şi este transmisă pe verticală, iar *Chlamydia* are o fază extracelulară.

** Sistemul enzimatic Lipmann cuprinde enzimele care convertesc energia potenţială a moleculelor, în energie utilă; enzimele care catalizează sinteza proteică (cu participarea ribosomilor şi a ARNt); componentele catenei de respiraţie celulară.

Caracterele enumerate în tabel relevă câteva particularităţi structurale şi funcţionale cu totul speciale, proprii exclusiv virusurilor. Conceptul de virus, definit pe baza însumării unui număr mare de criterii discriminatorii faţă de celula bacteriană, reflectă o totală lipsă de concordanţă şi absenţa oricărei afinităţi structurale şi funcţionale între virusuri şi sistemul biologic în forma sa cea mai simplă – celula bacteriană.

17.3. Natura virusurilor

Virusurile sunt entităţi infecţioase complexe şi organizate, deoarece conţin două componente esenţiale: una *genetică* (acidul nucleic) şi una *proteică*. Uneori, proteinele nu sunt esenţiale pentru exprimarea proprietăţilor sistemului, pentru că acidul nucleic în stare pură este infecţios. Caracterul înalt organizat al virionului rezultă din faptul că relaţiile spaţiale dintre genom şi capsidă sunt definite şi constante şi derivă din simetria la nivel molecular.

Virionii *nu au echipament enzimatic* propriu, producător de energie. Uneori, virionul conține *enzime de replicare* a genomului. Consecința este că virionul nu are metabolism, nu crește și nu se divide. Virusurile realizează complexe biologice numai în contextul procesului infecțios în celula sensibilă. In afara relațiilor cu celula gazdă, virionul matur este o *entitate inertă*. Deoarece nu au metabolism propriu, virusurile nu se multiplică, ci *sunt multiplicate* de celulă, pornind numai de la genomul viral și nu de la ansamblul integrat al constituienților structurali. Infecția virală este rezultatul pătrunderii în celulă, a virionului sau numai a acidului nucleic viral. Pentru sinteza componentelor virale este utilizat aparatul structural și enzimatic al celulei infectate (ribosomii și enzimele catalizatoare). Instrucțiunile programului genetic viral sunt executate numai în celula vie.

Starea de dependență totală a multiplicării virale de substratul celular viu, corespunde relației de *parazitism absolut*, fundamental distinctă de cea a *parazitismului obligat*, caracteristic unor micro-organisme patogene (*Treponema, Rickettsia, Chlamydia* etc.). Aceste bacterii preiau substanțele nutritive din celula gazdă, au propriul aparat de sinteză a macromoleculelor componente, își păstrează totdeauna integritatea structurală. Diviziunea lor are loc pornind de la ansamblul integrat al structurilor celulare.

În contrast, multiplicarea virală necesită, în esență, numai genomul viral, toate celelalte componente necesare multiplicării fiind de origine celulară.

În acord cu concepția veche, virusurile sunt organisme primitive – "*contagium, vivum, fluidum*" – așa cum le-a definit Beijerinck (1897). Concepția a dăinuit datorită prezenței în structura virusurilor, a două componente definitorii pentru lumea vie – *acizii nucleici și proteinele*. Dar proprietățile particulare ale sistemelor biologice nu sunt date de moleculele componente, ci de nivelurile superioare de integrare funcțională a componentelor structurale.

Dificultatea majoră a încadrării virusurilor în categoria sistemelor vii sau nevii, decurge din faptul că, în prezent, *nu există o definiție* unanim acceptată a vieții. Definițiile se reduc la o enumerare a proprietăților observabile ale unui organism, dar multe dintre proprietățile viului se întâlnesc și la formele de organizare ale materiei neanimate. Szent-Gyorgyi consideră că viața este o calitate a unor sisteme fizice, o expresie a interacțiunilor dintre structurile care alcătuiesc sistemul, dar este greu de definit.

In sprijinul concepției apartenenței virusurilor la lumea vie, a fost invocat *procesul multiplicării* lor, considerat ca fiind analog multiplicării celulelor bacteriene. Studiile ulterioare de biologie moleculară, au evidențiat diferențierea netă, de fond, între multiplicarea virală și multiplicarea bacteriană: virusurile se multiplică într-un substrat celular viu, pornind exclusiv de la *genomul viral*, după modelul furnizat de informația genetică înscrisă în genom.

Dintre marii virologi, foarte puțini susțin ca virusurile sunt vii. S. Luria (1973) le consideră vii, pornind de la un punct de vedere foarte original de a defini sistemele biologice: el consideră că un sistem biologic (care are calitatea de viu) este o entitate care, după ce a fost izolată, își păstrează o configurație specifică și prin aceasta, posibilitatea de a fi reintegrată în circuitul materiei vii. Din acest punct de vedere, virusul este un organism într-o măsură mai mare chiar decât o celulă din organismul unui metazoar.

Viața reprezintă capacitatea de a reproduce un anumit tip de organizare specific și independent: după Luria, o moleculă de ADN, *in vitro*, este vie, pentru că își păstrează conformația, are o structură și o organizare proprie, un anumit grad de autonomie.

Cei mai mulți autori consideră că *încadrarea virusurilor în lumea vie este imposibilă, artificială sau forțată*.

În evoluție, *viul* începe numai după constituirea unui *program genetic*, dar proprietatea fundamentală a viului este *capacitatea de autoreproducere*.

Virusurile posedă anumite *proprietăți ale sistemelor vii*: au un program genetic, se disemineză, sunt sensibile la acțiunea factorilor de mediu, dar sunt *lipsite de autonomie*, adică de *capacitatea de a se manifesta ca sisteme biologice de sine stătătoare. Lipsa de autonomie le plasează în afara sferei viului.* Virusurile nu se reproduc ca sisteme autonome, ci sunt multiplicate numai de sistemele celulare.

Rich A. (1980) caracterizează sistemele vii, în funcție de fluxul diferitelor elemente și procese pe care le desfășoară. Sistemele biologice realizează un flux triplu: *de energie, de materie și de informație*, care coordonează multitudinea reacțiilor chimice. Virusurile sunt sisteme informaționale. Prin programul genetic, virusurile interacționează cu sistemele vii, fac schimb de informație genetică, dar virionul matur în afara celulei este inert.

După F. Jacob (1970), distincția dintre viu și neviu, o constituie *raportul celor două categorii de sisteme cu timpul.*

Organismele sunt indisolubil legate de timpul istoric, în sensul că sunt rezultatul unui proces istoric evolutiv. Nici una dintre structurile lor nu poate fi detașată de contextul istoric. Virusurile au un *timp istoric* al evoluției proprii, legat intrinsec de gazdele celulare, conservă experiența trecutului și o transmit, întocmai ca și ființele vii. Probabil că la origini au întrunit mai multe caracteristici ale viului, pe care le-au pierdut de-a lungul evoluției. Corpurile nevii nu depind de timpul istoric.

După Crick (1966), un sistem biologic trebuie să îndeplinească trei condiții minimale: 1) să aibă capacitatea de *creștere*; 2) să aibă *metabolism* (să facă sinteze moleculare și să producă energie); 3) să se autoreproducă. El consideră că încadrarea virusurilor în sistemele vii, înseamnă a extinde proprietățile lor dincolo de anumite limite. Virusul în afara relației sale cu substratul celular nu este viu, dar sistemul virus-celulă are toate proprietățile sistemului biologic.

Monod (1971) consideră că sistemele biologice sunt singurele din univers, dotate cu următoarele patru proprietăți definitorii esențiale: 1) *morfogeneza autonomă* (proprietatea de a se construi ele însile); 2) *emergența* (proprietatea de reproducere); 3) *reproducerea* la nivel molecular, cu caracter predominant nevarietar; 4) *teleonomia* (proprietatea de a avea o structură și o organizare adaptate supraviețuirii individului și speciei). Virusurile nu îndeplinesc aceste criterii.

Pentru A. Lwoff (1981), organismul viu este un sistem ordonat și integrat, de structuri și funcții interdependente, capabil de metabolism, creștere și reproducere. Ceea ce determină complexitatea unui organism superior organizat, în raport cu un virus nu este complexitatea superioară a moleculelor sale, ci gradul mai înalt de organizare și integrare a acestor molecule.

Insumând aceste criterii, uneori complementare, prin care sunt definite sistemele biologice, concluzia este că unitatea fundamentală (ce răspunde acestor criterii), care stă la baza organizării tuturor sistemelor biologice este *celula.*

Dintre toate celulele cunoscute, bacteria reprezintă cea mai simplă unitate de integrare și reproducere, care reunește calitățile de organizare, autonomie și invarianță, prin care se caracterizează sistemele vii. Celula bacteriană constituie *un minim vital,* situată la frontiera lumii vii. Nivelul inferior celulei bacteriene se definește în termeni de chimie și de fizică, iar sistemele superioare, în termeni de organizare (F. Jacob, 1970).

"Pentru că virusurile nu sunt nici organisme, nici celule, ele nu sunt ființe vii. Virusurile sunt virusuri pentru ca virusurile sunt virusuri" (A. Lwoff. 1962, 1981).

17.4. Simetria virusurilor

Simetria este definită de aranjarea ordonată și repetată într-un ansamblu, a subunităților sale identice ca formă și mărime, dispuse în jurul unui plan sau al unui ax.

Mult timp după descoperirea virusurilor și după acceptarea naturii lor nucleoproteice s-a considerat ca genomul este acoperit de o moleculă proteică uriașă. Intr-o capsidă de dimensiuni medii, intră circa 330 000 de aminoacizi. Dacă fiecare aminoacid este codificat de trei baze, pentru edificarea structurii capsidei ar fi necesar un genom care să cuprindă circa un milion de nucleotide. Dar numai cele mai mari virusuri (Mimivirus) au un genom de asemenea dimensiuni. În cursul sintezei unei molecule proteice atât de mari, ar crește mult șansa încorporării greșite a aminoacizilor, astfel încât moleculele proteice ar fi inutilizabile pentru morfogeneza virală. Ineficiența asamblării ar fi un dezavantaj incompatibil cu perpetuarea virusurilor în natură.

Watson și Crick (1956) au adus dovada că genomul viral, datorită dimensiunilor sale reduse nu poate codifica sinteza unei molecule mari* și nici sinteza unui număr mare de proteine diferite. Ei au presupus că în alcătuirea capsidei intră un număr mare de *molecule identice, dispuse după o arhitectură riguros simetrică.* Ipoteza a fost verificată prin metode biochimice, de analiză a gr. mol. a proteinelor capsidale și a compoziției lor în aminoacizi.

* Avantajele folosirii subunităților mici pentru a construi structuri complexe sunt multiple:
1. reduce cantitatea de informație genetică necesară;
2. asamblarea și dezasamblarea pot fi ușor controlate, deoarece subunitățile se asociază prin legături multiple cu nivel energetic scăzut;
3. erorile în sinteza structurii sunt mai ușor evitate, deoarece mecanismele de corecție pot opera în cursul asamblării pentru a exclude subunitățile malformate.

În natură există exemple de structuri cu *simetrie moleculară*: toate cristalele au moleculele componente aşezate simetric. Ele au inspirat pe autorii modelului aşezării simetrice a moleculelor capsidei virale.

În structura moleculară a capsidei intră un număr fix de molecule proteice de acelaşi tip, sau un număr limitat de tipuri diferite, dispuse obligatoriu într-o aranjare simetrică. Ca şi în structura cristalelor, ele au o aranjare perfect ordonată.

Watson şi Crick au dedus că dintre toate tipurile de simetrie cunoscute, numai simetria helicală şi cea cubică, permit împachetarea ordonată a subunităţilor componente, realizând simultan şi condiţia obligatorie a identităţii ambianţei lor chimice. La baza simetriei moleculare a cristalografiei geometrice stă *principiul echivalenţei.* Conform acestui principiu, oricare dintre componentele unei structuri cu organizare simetrică, trebuie să se afle în ambianţa unor componente echivalente. Deoarece elementele de construcţie ale capsidei virale (capsomerele), uneori nu sunt perfect identice (unele sunt trimere, altele sunt pentamere), iar pe altă parte, moleculele mari sunt uşor deformabile, principiul echivalenţei este încălcat şi se aplică principiul *cvasiechivalenţei.*

S-au descris trei tipuri de simetrie virală:

1. *simetria helicală* (la virusul mozaicului tutunului, la mixo-, paramixo-, rhabdovirusuri etc.);
2. *simetria icozaedrică* (la polio-, adeno-, herpesvirusuri);
3. *simetria mixtă*, la fagii din seria T par (capul are simetrie icozaedrică, iar coada are simetrie helicală).

17.4.1. Simetria helicală

Simetria helicală este definită de aşezarea unităţilor componente în jurul unui ax, care este supus, concomitent, unei mişcări de *rotaţie* şi unei mişcări de *translaţie*, paralelă cu acelaşi ax (mişcarea este similară unui şurub). Capsomerele sunt aşezate în mod repetat, având poziţii rezultate din cele două tipuri de mişcare simultană în jurul axului şi paralelă cu acesta, astfel încât definesc o suprafaţă cilindrică, cu o structură helicală.

Unele virusuri au nucleocapside helicale *flexibile*, ceea ce le permite să dobândească o formă sferică (izodiametrică, după ce sunt învelite de peplos, sau o formă lineară flexuoasă, dacă sunt nude (de exemplu, unii bacteriofagi). Cele cu nucleocapsidă *rigidă* au formă cilindrică.

Dintre virusurile cu simetrie helicală, cu nucleocapsidă rigidă, cel mai cunoscut este VMT. Diametrul extern al cilindrului este de 18 nm, iar cel intern, de 4 nm. Lungimea cilindrului este de 300 nm. Capsida este alcătuită din 2130 capsomere identice, formate la rândul lor dintr-o singură unitate proteică (capsomere monomere), cu gr. mol. de 17,5 kDa, fiecare proteină având 158 aminoacizi, a căror secvenţă este cunoscută. Genomul său este o moleculă de ARN monocatenar, lineară, cu gr. mol. de 2×10^6 D, aşezat în zona centrală a virionului, inclavat între capsomere. Configuraţia spaţială a genomului este o spirală cu diametrul de 8 nm (mai mare decât diametrul intern al cilindrului). Din această cauză, spirele de ARN genomic se inclavează şi se inseră printre moleculele proteice capsidale, deoarece acestea sunt deformabile, nefiind corpuri geometrice perfecte. Fiecare capsomeră are raporturi spaţiale cu trei nucleotide. Fiecare tur de helice a ARN conţine 49 de nucleotide, care se găsesc în raporturi spaţiale cu 16,3 molecule proteice, aşezate helical.

Unele virusuri nude, cu simetrie helicală au aspectul unor filamente flexibile şi o structură tubulară mai laxă (fagii filamentoşi). O serie de virusuri infecţioase pentru om şi animale prezintă o nucleocapsidă cu un grad foarte accentuat de flexibilitate, astfel încât virionul ia forma sferică. Faptul se explică prin flexibilitatea individuală a fiecărei capsomere, evidenţiată la paramixovirusuri. Cele mai reprezentative virusuri cu capsidă helicală flexibilă aparţin familiilor *Orthomyxo, Paramyxo-* şi *Rhabdoviridae.*

17.4.2. Simetria icozaedrică

Virusurile cu simetrie icozaedrică au fost considerate ca având o formă sferică (izodiametrică), deoarece pe imaginile electrono-optice, la o mărime moderată, aspectul lor este sferic. In realitate,

aceste virusuri au un contur hexagonal, datorită capsidei lor poliedrice, cu un înalt grad de organizare, constituită din capsomere aşezate după o simetrie riguroasă.

Virionii cu simetrie icozaedrică, în aparenţă de formă sferică, sunt constituiţi din capsomere asimetrice (neidentice), aşezate în jurul axelor de simetrie.

Spre deosebire de VMT, la care unitatea proteică este în acelaşi timp şi unitate de structură, la virusurile cu simetrie icozaedrică, unităţile morfologice vizibile la microscopul electronic (capsomerele) sunt alcătuite din câteva (3–5) subunităţi proteice. Ca urmare, ambianţa fiecărei subunităţi şi legăturile cu vecinele sale nu sunt perfect identice, ci aproximativ echivalente sau *cvasiechivalente* (Caspar şi Klug, 1962).

Conturul hexagonal foarte regulat al virusurilor sferice, aşa cum apare la microscopul electronic la măriri înalte sugerează ideia că forma lor ar fi apropiată de aceea a unui corp solid cu toate feţele identice, cu toate laturile şi unghiurile egale. Din cele 5 corpuri solide euclidiene care răspund acestor condiţii şi anume, *tetraedrul, cubul, octaedrul, dodecaedrul* şi *icozaedrul*, ultimul dă un profil hexagonal al umbrei sale, în cele mai multe orientări ale fasciculului de lumină.

Simetria icozaedrică a virusurilor "sferice" a fost clarificată după mai multe experienţe şi demonstraţii intuitive. In microscopia electronică s-a utilizat pe scară largă, tehnica de umbrire a preparatului viral, adică acoperirea sa cu un strat monoatomic de metal (aur) pulverizat. Astfel, dimensiunile particulelor virale se măresc artificial. Metalizarea măreşte densitatea virionilor la fluxul de electroni şi evidenţierea lor este mai uşoară. Williams şi Smith (1958) au demonstrat că umbrele proiectate de un icozaedru pe o suprafaţă plană pe care este aşezat şi iluminat din diferite unghiuri corespund exact imaginii electrono-optice a virusului *Tipula iridescent* (patogen pentru larvele de insecte) umbrit prin metalizare. Expuse la fluxul de electroni, particulele virale icozaedrice, umbrite, nu dau o umbră sferică, ci o umbră care sugerează organizarea lor poligonală. Forma umbrei este diferită în funcţie de incidenţa fasciculului de electroni, dar totdeauna sugerează a fi dată de un poligon cu toate feţele identice, cu toate laturile şi unghiurile egale. Dintre cele 5 solide analizate, iluminate în aceleaşi condiţii sub diferite unghiuri de incidenţă, umbra dată de virionii umbriţi prin metalizare se aseamănă cel mai mult cu umbra rezultată după iluminarea laterală a *icozaedrului*. Icozaedrul este un poliedru regulat cu 20 de feţe, toate triunghiuri echilaterale (*eicosi*, lb. greacă = 20), 30 de muchii (creste) şi 12 vârfuri (vertexuri). El are cel mai înalt tip de simetrie, caracterizat ca fiind de tip 5: 3 :2, deoarece are 6 axe de simetrie rotaţională de ordinul 5, 10 axe de simetrie de ordinul 3 şi 15 axe de simetrie de ordinul 2.

Virusurile "sferice" prezintă şi ele o simetrie de ordinul 5: 3: 2, deoarece capsomerele sunt aşezate pe /sau în jurul axelor de simetrie de tip 5: 3: 2 ale unui icozaedru. In natură există exemple similare. De exemplu, simetria de ordinul 5 este cea mai frecventă la flori. Trepiedul unui aparat fotografic are un ax de simetrie de tip 3. O scară în formă de spirală prezintă o simetrie rotaţională de tip 2 în jurul axului sau central.

17.4.3. Probleme legate de modul de construcţie a virionilor icozaedrici

Descoperirea simetriei icozaedrice a virionilor "sferici" ridică o serie de probleme privind modul în care poate fi construită o astfel de structură. In acest sens s-au elaborat o serie de ipoteze, fără ca până astăzi să se fi ajuns la o concepţie unitară.

Microscopia electronică a demonstrat în cazul virusurilor din această categorie, existenţa a două tipuri de capsomere, având 5 şi respectiv 6 laturi (pentoni şi hexoni), rezultând la rândul lor, din aranjarea smetrică a unor unităţi de construcţie mai mici. Problema construcţiei particulei virale constă în a identifica modul în care capsomerele de formă penta- şi hexagonală se pot aranja simetric pentru a acoperi o suprafaţă închisă, alcătuind un fel de cutie icozaedrică.

Încercând să explice această construcţie, Caspar şi Klug (l962) au recurs la unul din principiile de geometrie aplicată de arhitectul B. Fuller în construcţia domului geodezic. In proiectul de plan (realizat în construcţie) pentru cupola domului, Fuller a divizat suprafaţa unei sfere în faţete triunghiulare echilaterale, în raporturi cvasiechivalente, aranjate după o simetrie icozaedrică. Procedeul triangulării sferei oferă soluţia optimă pentru asamblarea unei cutii închise, construită din unităţi identice de structură. Un grad comparabil de cvasiechivalenţe nu poate fi realizat prin nici un alt model de subdivizare a suprafeţei unei sfere, deoarece creează tensiuni net superioare.

Unitățile moleculare identice ale capsidei, în acord cu ipoteza lui Caspar şi Klug (1962) se leagă specific şi formează o structură stabilă şi simetrică, deoarece există un număr limitat de căi în care o anumită unitate poate fi legată de vecinele sale pentru a forma un număr maxim de legături stabile. Cea mai simplă situație este aceea întâlnită la cristale, care apar ca o rețea periodic tridimensională, în care, fiecare unitate este în raporturi echivalente cu vecinele sale. In cazul particulelor virale, moleculele capsidale, deşi identice, nu sunt în raporturi exact echivalente, ci numai *cvasiechivalente*. Aşezarea subunităților de construcție în raporturi cvasiechivalente face posibilă asamblarea unui număr redus de subunități mai mari într-o capsidă puțin mai deformată, dar păstrând simetria icozaedrică.

Pentru a închide icozaedrul, sunt necesare două tipuri de unități de construcție: pentagonale şi hexagonale. Cele hexagonale sunt aşezate pe fețele şi pe muchiile icozaedrului, iar cele pentagonale, la vârfurile icozaedrului. Radiolarul *Aulonia hexagona* (descris de Haeckel) are scheletul calcaros, alcătuit din unități de formă hexa- şi pentagonală şi probabil a inspirat pe autorii acestui model de simetrie.

Relațiile dintre genom şi capsidă, la virusurile icozaedrice sunt greu de explicat. In unele cazuri, genomul viral în asociație cu una sau cu mai multe proteine bazice, formează regiunea centrală ("core") a nucleocapsidei cvasisferice. Alteori (la herpesvirusuri), genomul ADN este răsucit pe o structură formată din proteine fibrilare, rezultând o structură toroidală. La adenovirusuri, genomul are interacțiuni ferme cu proteinele capsidale, cea ce conferă stabilitate maximă structurii nucleocapsidice.

Cele mai importante familii de virusuri cu simetrie icozaedrică, din punct de vedere practic (clinic) şi teoretic sunt picorna-, adeno- şi herpesvirusurile.

Simetria icozaedrică prezintă avantaje funcționale importante, evidențiate prin eficiența multiplicării virale. Capsida icozaedrică oferă un volum mai mare pentru moleculele componente şi poate fi asamblată cu o mai mare economie de proteine, deoarece oferă posibilitatea împachetării mai compacte a genomului, comparativ cu cele helicale. De exemplu, genomul ARN al virusului mozaicului galben al napului este acoperit de 180 de molecule proteice, dispuse după o simetrie icozaedrică, în timp ce genomul VMT, de dimensiuni echivalente este acoperit de o capsidă alcătuită din 2130 capsomere. Alte avantaje sunt legate de uşurința asamblării particulei virale şi mai ales de stabilitatea structurii care rezultă.

17.4.4. Simetria binară

Simetria complexă sau binară este prezentă în modul cel mai evident la bacteriofagii cu coadă contractilă (de exemplu, fagii din seria T-par, care infectează *E. coli*), a caror structură formează un adevărat dispozitiv pentru injectarea ADN în celula bacteriană: capul are o simetrie *icozaedrică*, în timp ce capsomerele cozii sunt ordonate după o simetrie *helicală*.

Bibliografie

Holland J. J. 1990. Defective Viral Genomes, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Lemke P. A. 1976. Viruses of Eucariotic Microorganisms – Annu. Rev. Microbiol. 36: 105–145.

Navaratnarajah C. K., Warrier R., Kuhn R. K. 2008. Assembly of Viruses: Enveloped Particles, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Zarnea G. 1984. Tratat de Microbiologie generală, vol. I, Ed. Academiei RSR.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18. MULTIPLICAREA VIRUSURILOR

Virusurile sunt studiate nu numai pentru patologia pe care o determină la gazdele lor, ci şi ca sisteme model pentru studiul proceselor moleculare şi ca instrumente pentru identificarea unor căi de reglare. Studiile de virologie au dus la înţelegerea reglării genice pozitive şi negative, a interacţiunilor represor-operator, a replicării ADN, a alungirii şi terminării transcrierii, a semnalării imunitare, a înnădirii ARN, a transformării oncogene.

Multe virusuri se multiplică în culturi de celule sau în oul embrionat, în condiţii strict controlate. Inocularea organismului animal este încă folosită pentru izolarea primară a anumitor virusuri şi pentru studiile de patogeneză şi oncogeneză virală. Laboratoarele de diagnostic cultivă virusurile cu scopul de a le izola din probele clinice pentru a stabili cauza procesului patologic, iar laboratoarele de cercetare le cultivă pentru analiza expresiei genelor virale.

Multiplicarea este procesul complex în cursul căruia are loc transcrierea şi traducerea informaţiei genetice în proteine, replicarea genomului şi asamblarea virionilor progeni.

Procesul multiplicării virale prezintă particularităţi care decurg din *parazitismul absolut*, de nivel genetic, al acestor entităţi. Multiplicarea are loc exclusiv în celulele vii, care furnizează nu numai monomerii precursori ai macromoleculelor, ci şi întregul dispozitiv celular efector (ribosomi, enzime activatoare ale aminoacizilor, ARNt, diferiţi factori solubili, sistemele generatoare de energie etc.).

Celula infectată cu un virus constituie un complex viu – *complexul virus-celulă* – în care se desfăşoară două categorii de procese:

- *sintezele moleculare* specific virale;
- *diataxia* virală. Termenul de 'diataxie' (Lwoff, 1981) semnifică 'punerea în ordine' sau asamblarea moleculelor virale, în structuri specifice.

Multiplicarea virală este, în esenţă, rezultatul exprimării programului genetic viral, datorită căruia, ordinea celulară normală este înlocuită de ordinea virală. Informaţia genetică virală deviază metabolismul celulei.

Deşi celula poate asigura majoritatea funcţiilor multiplicării virale, adeseori este necesară acţiunea unor enzime virale cu rol de replicaze, existente în virion sau codificate timpuriu de genomul viral.

Numărul genelor virale diferă considerabil. Ele codifică sinteza următoarelor categorii de proteine:

- enzime pentru *replicarea genomului* viral (replicaze). Ele pot fi componente ale virionului infecţios sau se sintetizează în celulă, după infecţie;
- proteine *structurale*, componente ale capsidei şi peplosului;
- proteine *reglatoare*, de două categorii: a) cele care modifică specificitatea aparatului de biosinteză al celulei în sensul specificităţii virale; b) proteine reglatoare ale morfogenezei virale.

Multiplicarea virală (producerea particulelor virale progene) este condiţionată de infecţia fiecărei celule, *in vivo* sau *in vitro*, cu cel puţin o particulă virală. Practic însă, pentru a asigura infecţia fiecărei celule a unei culturi şi un grad foarte înalt de sincronizare a etapelor multiplicării sunt necesare 10–100 particule virale pentru fiecare celulă.

Calitatea unei celule sau a unui organism de a fi gazdă pentru multiplicarea unui virus poartă denumirea de *sensibilitate*.

Pentru ca o celulă să fie sensibilă la infecţie sunt necesare două condiţii:

- virionul să se fixeze stabil de componente moleculare ale suprafeţei celulei;

– celula să permită desfăşurarea ciclului de multiplicare (să fie permisivă). Particularităţile funcţionale ale celulelor care condiţionează desfăşurarea ciclului de multiplicare virală, au fost echivalate, prin analogie, cu factorii de creştere ai celulei bacteriene şi s-au denumit factori de multiplicare.

Tipurile de celule şi speciile de organisme pe care le poate infecta şi în care se poate multiplica un virus, definesc *spectrul său de gazdă*. Unele virusuri au spectrul de gazdă foarte larg şi se pot multiplica în celulele unor specii foarte diverse. De exemplu, arbovirusurile se multiplică în ţesuturile insectelor hematofage şi sunt transmise vertebratelor, la care produc infecţii. Unele rhabdovirusuri infecţioase pentru vertebrate se multiplică în ţesuturile insectelor, dar şi ale unor plante. Alte virusuri sunt foarte specializate şi infectează câteva tipuri de celule ale unei specii.

Multiplicarea virală se desfăşoară într-o serie de etape succesive, mai mult sau mai puţin secvenţiale, deşi o anumită fază se continuă în faza următoare, astfel încât după câteva ore de la infecţie, într-o singură celulă se pot întâlni majoritatea fazelor multiplicării unui virus cu genom ADN. Multiplicarea virală propriu-zisă este precedată de interacţiunea virionilor cu substratul celular.

18.1. Iniţierea procesului infecţios

Evenimentul preliminar al multiplicării este *adsorbţia* particulei virale, ca o consecinţă a ciocnirilor întâmplătoare a virionilor aflaţi în suspensie, cu suprafaţa celulei. Procesul adsorbţiei este ineficient, uneori fiind necesare milioane de ciocniri favorizate de mişcările browniene ale moleculelor din suspensie. Forţele *electrostatice* au rol important în realizarea adsorbţiei. Densitatea virionilor şi a celulelor influenţează decisiv eficienţa acestui proces, care este reversibil.

Fixarea ireversibilă (ataşarea) a virusului pe suprafaţa celulei, presupune acţiunea unui mecanism care stabilizează interacţiunea, până în momentul înglobării virionului. O particularitate a virusurilor şi anume *specificitatea* lor pentru o anumită categorie de celule, este în primul rând o specificitate de fixare, condiţionată de interacţiunea unei proteine virale (ligand* sau antireceptor), cu un constituient normal al suprafeţei celulare, care are rolul de *receptor de virus*.

* Ligandul este orice moleculă sau structură care mediază interacţiunea specifică sau nespecifică dintre un virus şi celulă sau dintre două celule.

Rolul interacţiunii specifice este demonstrat de faptul că acidul nucleic viral purificat este infecţios pentru un spectru mai larg de celule.

Gradul de specificitate a interacţiunii virus-celulă este diferit. Suprafaţa celulelor *vegetale* este acoperită cu ceară, pectină, dar mai ales cu un perete gros celulozic şi nu are receptori de virus. Nu se cunoaşte nici un virus infecţios pentru plante care să utilizeze receptori celulari specifici. Infecţia celulei vegetale este condiţionată de lezarea peretelui celulozic: virusurile sunt inoculate de vectori (artropode, nematode) care transmit virusul, sau prin leziunea mecanică a celulei.

Infecţia virală nu are consecinţe patologice dacă virusul nu se disemineză de la celula infectată iniţial (adeseori în frunze), la celulele învecinate. Trecerea virusului de la o celulă la alta este împiedicată de pereţii celulari. Dar, celulele conţin canale în peretele despărţitor (plasmodesme), ceea ce produce un continuum intercelular.

Diseminarea virusurilor la distanţă în ţesuturile plantei se face prin celulele perforate ale floemului.

Interacţiunea *fag-bacterie* este caracterizată printr-un grad înalt de specificitate (utilizată în scop practic pentru tipizarea fagică a tulpinilor bacteriene), iar aceea dintre virus şi *celula animală* are un nivel intermediar. Uneori, ataşarea virusului de celula animală este mediată de receptori foarte specifici, de aici decurgând *citotropismul*, cu consecinţe majore asupra patogenităţii virale. De exemplu, poliovirusul (un enterovirus) are specificitate de legare pentru celulele mucoasei intestinale şi pentru motoneuronii din coloanele anterioare ale măduvei spinării. In mod obişnuit, ciclul de multiplicare se desfăşoară în celulele mucoasei intestinale, fără manifestări clinice, dar după infecţia motoneuronilor survine paralizia musculară.

Se cunosc mai bine liganzii virali, decât *receptorii celulari*. Virionii înveliţi se leagă de receptorii celulari prin *glicoproteinele peplosului*, care adeseori proemină sub forma *spiculelor*.

Structurile de legare a virusurilor nude cu simetrie icozaedrică sunt situate la *vârfurile icozaedrului*. Ele sunt polipeptide ale capsidei sau sunt proteine fibrilare proeminente la vârfuri (de exemplu, fibra pentonică a adenovirusurilor).

Identificarea moleculelor cu rol de *receptor celular* de virus este dificilă, deoarece particula virală este un ligand de dimensiuni mari, ce interacționează cu o suprafață mare a celulei, la nivelul căreia se găsesc molecule de legare specifică și nespecifică. Pentru ca o moleculă membranară să aibă rolul de receptor pentru virus, în primul rând, trebuie să aibă o *densitate* suficient de mare pentru a asigura interacțiuni multiple cu ligandul viral. Pe de altă parte, virusul se poate lega de receptori diferiți pe diferite tipuri de celule. Totuși, s-au identificat receptorii celulari pentru câteva virusuri.

Din punct de vedere biochimic, receptorii celulari pentru virusuri sunt *glicoproteine, glicolipide* sau *glucide*. Specificitatea de legare este conferită de o parte a unei macromolecule sau de catenele glucidice ale conjugatelor glicoproteice.

Astfel, ligandul virusului influenza – *hemaglutinina* (o glicoproteină a peplosului) se leagă specific de resturile de *acid sialic* ale glicoproteinelor membranei citoplasmatice.

Receptorul pentru *acetilcolină*, de la nivelul sinapselor neuroefectoare poate avea rol de receptor și pentru *virusul rabic*.

Învelișul *HSV*$_1$ conține cel puțin 9 glicoproteine. Câteva (B, C, D, H, L) mediază legarea virionului de *heparan-sulfat**, cu rol de receptor celular. Glicoproteinele B și D mediază tropismul HSV$_1$ pentru neuronii SNC.

* Heparan-sulfatul este un proteoglican, o macromoleculă alcătuită dintr-o regiune centrală *proteică*, pe care se leagă covalent catene laterale de *glicozaminoglicani*, formând un *monomer proteoglicanic*. Mai mulți monomeri se leagă prin intermediul componentei proteice, de o moleculă lungă de *acid hialuronic*.

Glicozaminoglicanii (MPZ acide) sunt polizaharide ce conțin unități dizaharidice înalt repetitive.

Virusul Epstein Barr (EBV) produce mononucleoza infecțioasă, o maladie limfoproliferativă benignă. Este singurul virus al familiei pentru care s-a identificat un receptor de mare afinitate: *glicoproteina membranară CD*$_{21}$ (sau CR$_2$, adică receptorul pentru complement de tip 2, ce leagă C$_{3d}$). Receptorul CD$_{21}$ are rol în activarea limfocitelor B. În timpul activării cascadei C, C$_3$ este clivat în C$_{3b}$, care se leagă de complexele Ag-Ac. C$_{3b}$ este prelucrat proteolitic și rezultă C$_{3d}$. C$_{3d}$ atașat de complexul Ag-Ac, se fixează la limfocitul B, pe calea CR$_2$. C$_{3d}$ este ligandul natural pentru CR$_2$.

Receptorul pentru *HCMV* pare a fi molecula CMH I.

Receptorii celulari pentru virusurile nude cu simetrie *icozaedrică* sunt mai puțin cunoscuți.

Adenovirusurile se fixează prin intermediul fibrei pentonice, la o varietate de receptori celulari, inclusiv moleculele CMH I.

Receptorii pentru rhinovirusuri sunt moleculele intercelulare de aderență (ICAM-1). ICAM-1 se găsește pe celulele epiteliului cavității nazale și pe multe alte tipuri de celule din organism. Are 5 domenii extracelulare omologe domeniilor Ig (D1-D5), un domeniu transmembranar și un domeniu citosolic și face parte din suprafamilia Ig. Cele 5 domenii sunt așezate linear. Funcția normală este de a lega integrina LFA-1 de pe suprafața limfocitelor. Interacțiunea LFA-1-ICAM-1 mediază aderența dintre celulele epiteliale și limfocitele T care lizează celulele epiteliale infectate cu virus.

Expresia ICAM-1 pe celulele epiteliale ale cavității nazale este restrictivă în condiții normale, dar este indusă de mediatorii inflamației (IL-1, IFNγ, TNF) eliberați după infecția cu un rhinovirus, ceea ce ușurează diseminarea infecției. Pe de altă parte, inducția expresiei ICAM-1 este importantă pentru localizarea limfocitelor la situsul inflamației.

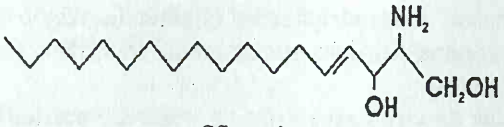
Molecula CD$_4$ are rol de co-receptor pentru recunoașterea ligandului HIV 1, în asociație cu moleculele CMH II, dar transmite și semnalul activator al celulei T.

Proteina CD$_4$ este un polipeptid de 55 kDa al membranei. Regiunea extracelulară conține 372 aminoacizi, ce formează 4 domenii, omologe cu ale moleculei de Ig.

HIV infectează și celule CD$_4^-$: neuroni, astrocite.

Utilizarea AMC specifici față de diferite componente membranare a dus la identificarea sfingolipidului* *galactozil ceramid* (Gal C), ca un posibil receptor pentru HIV pe membrana neuronală.

* Sfingolipidele sunt formate dintr-un aminoalcool cu 18 atomi de C (sfingozina). La gruparea –NH$_2$ a sfingozinei este legat un acid gras, (cu 24 atomi de C). Cele care conțin o grupare glucidică se numesc sfingoglicolipide.



Sfingozina

Celulele organismelor uman şi animal au receptori pentru un număr mare de agenţi infecţioşi. Teleonomic însă, moleculele cu rol de receptori nu sunt destinate legării virionilor, ci îndeplinesc diferite funcţii normale: de exemplu, unele au rol de *receptori de hormoni*. Moleculele care au rol de receptori de virus sunt polifuncţionale. Virusurile împrumută diferite molecule ale suprafeţei celulare, prin intermediul cărora dobândesc accesul în celulă. Numărul receptorilor de virus, pe suprafaţa unei celule este cuprins între 10^4–10^5.

Tropismul unor virusuri pentru anumite celule sau ţesuturi este determinat de specificitatea interacţiunii cu receptorul: de exemplu, tropismul HIV-1 pentru limfocitele T şi pentru macrofagele care prezintă receptorul CD_4; tropismul EBV pentru limfocitele B care conţin receptorul CD_{21}. Dar specificitatea şi distribuţia tisulară a receptorilor nu poate explica tropismul celor mai multe ribovirusuri, deoarece adeseori infecţia este abortivă: virionul este internalizat şi genomul este dezvelit, dar multiplicarea este stopată într-o etapă ulterioară, ceea ce sugerează existenţa unor factori celulari, care condiţionează sinteza macromoleculelor esenţiale ale ciclului de multiplicare virală (ARN, proteine). De exemplu, *virusul influenza* se fixează pe resturile de *acid sialic* ale glicoproteinelor şi glicolipidelor, care au o distribuţie ubicvitară în ţesuturi. Totuşi, infecţia cu virusul influenza este limitată exclusiv la celulele epiteliale ale tractului respirator al omului şi la modelele animale ale infecţiei. Pentru aceste virusuri, tropismul viral este condiţionat de existenţa *receptorilor celulari* şi de *starea de permisivitate* a celulei. Virusurile se multiplică în celulele care nu pot să declanşeze un răspuns antiviral mediat de IFN α/β.

Ataşarea de receptorii celulari este un proces reversibil. Dacă nu se produce internalizarea, virusul poate să se detaşeze (fenomen denumit *eluţie*), de pe suprafaţa celulei. Virionul care se detaşează din interacţiunea cu un receptor se poate reabsoarbi pe altă celulă. Unele virusuri au mecanisme speciale de eluţie. Detaşarea virionilor ortho- şi paramyxo- este mediată de neuraminidază (NA), o *esterază* care clivează resturile de acid sialic din catenele glucidice ale glicoproteinelor. Resturile de acid sialic rămân legate de HA şi previn legarea de alt receptor. De aceea, se admite că rolul NA este de a desializa glicoproteinele pe măsură ce ele sunt inserate în învelişul viral nascent.

De cele mai multe ori, ataşarea virusului determină modificări ireversibile în structura receptorului şi în mod obligatoriu urmează *internalizarea* (înglobarea virusului în celulă).

După legarea virusului, receptorii celulari se modifică. Astfel, glicoproteina CD_4, după interacţiunea cu HIV *se fosforilează*, o modificare esenţială pentru înglobarea virionului. Inhibiţia fosforilării cu inhibitori ai protein-kinazei blochează înglobarea şi virionii rămân la suprafaţa celulei. Fosforilarea declanşează semnalul reorganizării citoscheletului.

Chiar dacă virusul nu pătrunde în celulă, legarea sa de membrana citoplasmatică influenţează activitatea celulei. De exemplu, legarea VEB de suprafaţa limfocitului B poate iniţia activarea acestuia.

18.2. Pătrunderea virusului în celulă (infecţia propriu-zisă)

Faza de pătrundere sau de înglobare a virusurilor în celulele sensibile se desfăşoară după mecanisme diferite, derivate din complexitatea structurilor de suprafaţă ale celulei şi ale virionului.

Peretele mureinic al bacteriilor Gram pozitive, complexitatea structurală a peretelui bacteriilor Gram negative, precum şi natura celulozică a peretelui vegetal constituie bariere foarte eficiente faţă de infecţia virală. Celulele vegetale sunt infectate numai după leziunea mecanică a peretelui celulozic, iar fagii din seria T-par au un aparat complex, foarte specializat, prin intermediul căruia genomul viral este injectat în celula bacteriană.

Virusurile infecţioase pentru celulele animale sunt înglobate în întregime în celula sensibilă, consecinţa directă a absenţei peretelui celular.

Pătrunderea virusurilor în celula animală, după fixarea ireversibilă se poate produce prin două mecanisme fundamentale: *endocitoza şi fuziunea.*

Mecanismul predominant prin care virusurile pătrund în celula animală este *endocitoza* (denumită şi *viropexie*) (fig. 378), un proces analog celui de pinocitoză, caracteristic virusurilor nude (adeno-, reovirusuri), dar şi unor virusuri învelite (influenza, rhabdo-, poxvirusuri).

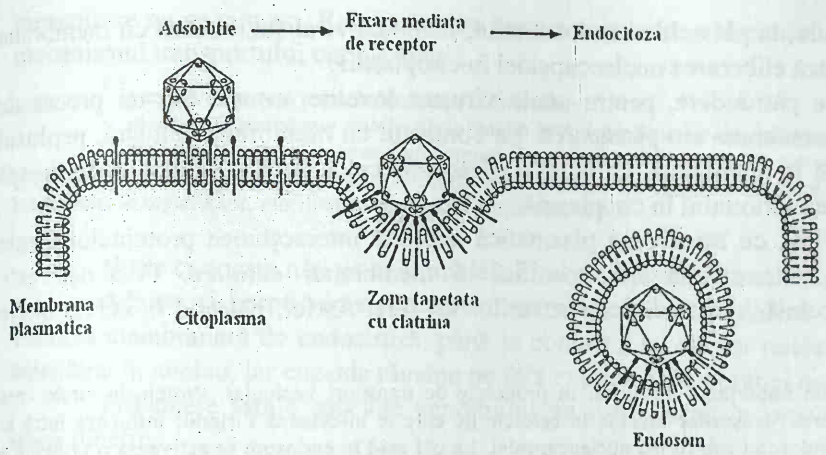


Fig. 378. Înglobarea unei particule virale nude prin mecanismul endocitozei mediată de receptori.

Interacțiunea inițială a virionului cu receptorii din membrana* celulară nu este suficientă pentru a declanșa endocitoza particulei legate, ci reprezintă *semnalul*** pentru inițierea agregării proteinelor contractile ale celulei și pentru formarea unor pseudopode.

* In membrana celulelor eucariote, lipidele nu sunt distribuite uniform (așa cum afirmă teoria mozaicului fluid). Unele zone ale membranei (microdomenii) sunt bogate în lipide particulare (sfingolipide, colesterol), cu care proteinele membranare integrate se asociază preferențial. Proteinele integrate se ancorează de catenele de acizi grași sau de GPI (glicozil-fosfatidil-inozitol). Microdomeniile formează pontoane lipidice relativ rezistente la solubilizare cu detergenți, sunt structuri mai rigide comparativ cu restul membranei, dar dinamice, adică pot fuziona formând pontoane mai mari sau se dezagregă în structuri mai mici. In pontoane se găsesc în special acele proteine care se leagă cu lipidele (GPI).

** Celulele (cu excepția fagocitelor profesioniste) au capacități endocitare foarte limitate. După fixarea virionului de receptor, este indusă *endocitoza*, ce constă în reorganizarea unor componente ale citoscheletului.

Formarea pseudopodelor ușurează interacțiunile multiple ale suprafeței virionului cu receptorii celulei. Proteinele contractile ale citoplasmei se activează și realizează închiderea particulei virale, într-o vacuolă de endocitoză, denumită *microveziculă* sau *pinosom* tapetat cu *clatrină**, printr-un mecanism asemănător închiderii unui fermoar (fig. 379).

* *Clatrina* este o proteină mare, oligomerică, ce formează o rețea pe suprafața internă a membranei plasmatice, favorizând intruzia membranei și formarea unei vezicule tapetată cu rețeaua moleculară, care ulterior poate fuziona cu alte organite celulare.

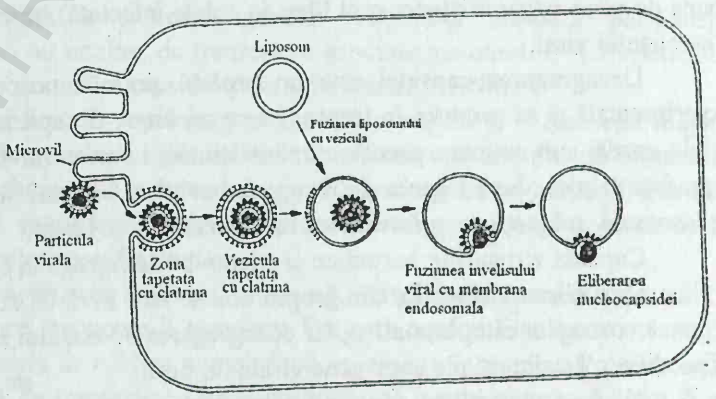


Fig. 379. Unele virusuri animale învelite intră în celulă, fiind endocitate în vezicule tapetate cu clatrină. Vezicula de fagocitoză își pierde învelișul de clatrină și fuzionează cu lizosomii. Scăderea pH în veziculă determină fuziunea învelișului viral cu membrana veziculei endosomale și eliberarea nucleocapsidei în citoplasmă.

Marginile libere ale membranei celulare intruzate, fuzionează și restabilesc integritatea suprafeței celulare, astfel încât virusul rămâne inclus într-o veziculă de endocitoză. Vezicula pierde învelișul de clatrină și fuzionează cu mici cisterne de reticul endoplasmic neted și cu lizosomi. Se formează un *endosom* al cărui pH se acidifică sub acțiunea unei *pompe protonice* din membrană. Pe măsură ce pH scade, proteinele capsidei suferă modificări de conformație și expun un domeniu hidrofob ce determină fuziunea cu membrana endosomului. Acesta este mecanismul de pătrundere a virionilor nuzi, prin *liza endosomului*. Virusul eliberat din endosom este fie sub forma nucleocapsidei (adeno-, herpes), fie sub forma nucleoproteinelor (enterovirusuri).

Pentru virusurile învelite, la pH acid al endosomului, învelişul viral fuzionează cu membrana endosomului, ceea ce favorizează eliberarea nucleocapsidei în citoplasmă.

Al II-lea mecanism de pătrundere, pentru unele virusuri învelite, constă într-un proces de *fuziune* a învelişului viral cu membrana citoplasmatică. La contactul cu membrana celulară, peplosul se dizolvă şi rămâne încorporat în membrană. La locul coalescenţei celor două structuri, se formează un "canal", care permite trecerea virionului în citoplasmă.

Fuziunea învelişului viral, cu membrana plasmatică necesită interacţiunea proteinelor virale "de fuziune" ale peplosului, cu constituienţii specifici ai membranei celulare. Fuziunea este modalitatea de pătrundere în celulă, caracteristică virusurilor învelite. Astfel, pătrund în celulă unele paramixo- şi poxvirusuri.

Fuziunea membranară este importantă nu numai în procesele de transport vezicular. Proteinele virale care mediază fuziunea uşurează pătrunderea virusurilor învelite în celulele pe care le infectează. Virionul influenza intră în celulă prin EMR şi este eliberat în endosomi sub forma nucleocapsidei. La pH acid în endosom se activează o proteină a învelişului viral care catalizează fuziunea acestuia cu membrana endosomului. Astfel, acidul nucleic viral cu proteinele asociate sunt eliberate în citosol.

Genele care codifică proteinele de fuziune au fost clonate şi s-a făcut transfecţia celulelor mamaliene *in vitro*. Celulele exprimă proteinele virale pe suprafaţă şi în anumite condiţii fuzionează, formând celule gigante multinucleate.

Studiul structurii tridimensionale a proteinei de fuziune prin cristalografie cu raze x a evidenţiat că pH acid induce schimbarea conformaţională a proteinei de fuziune, care expune o regiune hidrofobă, ce interacţionează cu dublul strat lipidic al membranei.

Paramixovirusurile conţin, inclavată în peplos, *o proteină de fuziune* (F), care mediază fuziunea învelişului viral cu membrana celulei sensibile. Proteina F mediază fuziunea celor două structuri, numai dacă este *inclavată* în învelişul fosfolipidic viral şi dacă este ţinută în contact strâns cu membrana celulară, prin intermediul hemaglutininelor.

Cele două mecanisme de înglobare (endocitoza şi fuziunea) nu se exclud reciproc. Acelaşi virus învelit poate fi înglobat pe o cale sau alta, în funcţie de substratul celular. Mai mult, cele două mecanisme pot coexista frecvent pentru un virus dat, în raporturile sale cu o linie celulară.

Rareori, virionul pătrunde în celulă, prin modalităţi particulare, ce constau în liza locală a membranei plasmatice, la contactul cu virionul. Se produce liza peplosului viral şi a membranei celulare sau virionul trece intact prin breşa membranară.

Decapsidarea este procesul de conversie treptată a virusului, din starea de virion complet, la starea de *virus vegetativ*-(genomul liber în celula infectată), prin pierderea capsidei şi, când este cazul, a învelişului viral.

Dezagregarea capsidei este un proces puţin cunoscut, datorită dificultăţilor de modelare experimentală şi se produce în trepte. La *reovirusuri*, decapsidarea se iniţiază înainte de contactul cu celula gazdă, sub acţiunea proteazelor intestinale. La *picornavirusuri*, capsida se dezagregă parţial la suprafaţa celulei, după legarea de receptorul celular. Cel mai adesea, decapsidarea are loc *în vezicula endosomală*, sub acţiunea proteazelor lizosomale şi a pH acid.

Capsida virusurilor herpetice şi adeno- se dezagregă la contactul cu *porul nuclear*.

Dezvelirea virusurilor din grupul pox se face în două etape: învelişul extern este degradat sub acţiunea enzimelor citoplasmatice, iar dezagregarea învelişului intern şi eliberarea ADN este catalizată de produsele de sinteză ale unor gene virale timpurii.

In vitro, dezvelirea virusurilor cu peplos este modelată sub acţiunea detergenţilor neionici (polieteri şi esteri poliglicerici, de exemplu, Tween 80). Aceştia interacţionează cu componentele hidrofobe ale membranei şi astfel peplosul este rupt şi solubilizat.

Transportul intracelular până la locul multiplicării este necesar numai pentru virusurile care se multiplică în nucleu. Cele care se multiplică în *citoplasmă* ajung uşor la sediul desfăşurării procesului, imediat după ce au străbătut membrana citoplasmatică.

Virusurile care se multiplică în *nucleu*, necesită transferul genomului şi a proteinelor asociate, prin membrana nucleară. Deplasarea lor pare a fi "orientată" de un tropism molecular ale cărui

mecanisme nu se cunosc. Reorganizarea unor componente ale citoscheletului* are un rol important în mecanismul transportului citoplasmatic.

* În celula eucariotă citoscheletul este format din:
– *structuri filamentoase stabile*, alcătuite din proteinele filamentelor intermediare;
– *structuri dinamice*: *microtubuli* formați din tubulină și *filamente* de actină. Acestea se pot asambla, dezasambla și redistribui rapid în celulă, ca răspuns la semnalele reglatoare ale funcțiilor celulare: progresia în ciclul celular, transportul intracelular al organitelor, motilitatea, controlul formei celulare.

Nu se cunoaşte nici un acid nucleic viral transportat în nucleu ca moleculă liberă.

Adeno- şi herpesvirusurile sunt transportate prin citoplasmă sub forma *nucleocapsidelor*, în vacuola membranară de endocitoză, până la contactul cu un por nuclear, prin care acidul nucleic este transferat în nucleu, iar capsida rămâne pe fața externă a membranei nucleare.

Proteinele virale asociate genomului au rol esențial în procesul de transport și îndeplinesc două funcții:

– furnizează *semnale specifice* și orientează transportul complexului spre nucleul celulei;
– conferă o *conformație stabilă* complexului, compatibilă cu transferul prin porii membranei nucleare.

Acizii nucleici monocatenari sunt transportați cu o eficiență mai mare deoarece moleculele monocatenare sunt polare, mai flexibile. De exemplu, ARN de influenza este transportat în nucleu sub forma ribonucleoproteinei. Proteinele complexului mediază transferul nuclear.

Dezoxiribovirusurile și retravirusurile intră în nucleul celulei, fie ca particule întregi (nucleocapside), fie sub forma complexelor nucleoproteice (ADN și proteinele asociate). Nu se cunoaşte mecanismul prin care nucleocapsida interacționează cu membranele nucleare. Transferul complexului nucleoproteic în nucleu se realizează probabil prin fuziunea nucleocapsidei cu membrana nucleară.

Virusurile nude din grupul *Papova* pătrund în nucleu ca virioni întregi, prin fuziunea nespecifică a veziculei de endocitoză, cu membrana nucleară externă, după care, virionul sau numai complexul nucleoproteic trece în nucleoplasmă, prin fuziunea vacuolei cu membrana internă.

Tranzitul acestor virusuri în nucleu este rapid (virionii de SV_{40} se găsesc în nucleu la 15 min. după infecție) și se explică prin tropismul nuclear al proteinelor.

18.3 Sinteza ARNm viral

Transcrierea este prima treaptă a expresiei genelor virale și urmează pătrunderii nucleocapsidei în celulă. Unele virusuri au enzime de transcriere asociate genomului. Activitatea lor începe foarte curând după dezagregarea parțială a capsidei și se sintetizează ARNm.

Existența mesagerilor cu specificitate virală este o condiție esențială și o restricție majoră pentru inițierea procesului de multiplicare virală. Virusul trebuie să ofere aparatului de sinteză al celulei, un ARNm pe care celula trebuie să-l recunoască și să-l traducă în proteine. Generarea mesagerilor virali semnifică începutul subordonării aparatului de sinteză proteică și trecerea de la sinteza proteinelor celulare, la sinteza celor specific virale.

În citoplasmă nu s-a detectat activitate ARN-polimerazică, astfel încât genomul virusurilor care nu au enzime proprii de transcriere, nu poate fi transcris. Datorită acestui fapt, genomul ADN (adeno-, herpes, papova) poate fi transcris în ARNm numai după ce ajunge în nucleu. Poxvirusurile sunt o excepție. Ele au propria enzimă de transcriere (ARN-polimeraza) pentru sinteza ARNm și se multiplică în citoplasmă.

Ribovirusurile se multiplică în citoplasmă. Genomul viral ARN este transcris în ARNm de o enzimă proprie de transcriere, ori ARN genomic funcționează și ca ARNm.

Sinteza ARNm viral este catalizată de două categorii de polimeraze:

– *ARN-polimeraza II celulară*, pentru virusurile a căror informație genetică este transcrisă în nucleu (dezoxiribovirusuri);

– *ARN-polimeraza virală*, pentru cele care se multiplică în citoplasmă (poxvirusuri și ribovirusri). Cele două tipuri de polimeraze au omologii extinse ale secvenței de aminoacizi, inclusiv

ale secvenței Gly-Asp-Asp. Acest tripeptid se găsește chiar și în ARN-polimeraza fagică și în reverstranscriptază. De aceea, se consideră că are rol în recunoașterea matriței de acid nucleic.

Cele mai multe molecule de ARNm viral sunt *monocistronice.*

18.3.1. Sinteza ARNm la dezoxiribovirusuri

Toate genomurile ADN lineare, mono- sau dublu catenare au secvențe repetate invers, fie la extremități (adeno-), fie atât la extremități, cât și în interior.

Genomul ADN viral se disociază de proteinele specifice de împachetare, acestea fiind înlocuite de *histonele* celulei. Astfel, ADN dobândește o structură nucleosomală, asemănătoare cu a ADN celular, favorabil proceselor de replicare și transcriere.

Sinteza ARNm este rezultatul transcrierii unicei catene, la cele cu genom monocatenar, sau a uneia dintre catene, la cele cu genom dublu catenar.

Clasificarea dezoxiribovirusurilor în funcție de tipul de acid nucleic genomic și de modul de transcriere a ARNm distinge :

– clasa I-a: virusurile cu genom ADN dc. ARNm este transcris prin mecanismul clasic al matriței ADN dc;

– clasa II-a: virusurile cu genom ADN mc. Catena de ADN are polaritate pozitivă ca și ARNm sau are polaritate negativă, opusă ARNm. Sinteza ARNm are loc numai după ce molecula genomică monocatenară este convertită la moleculă dublu catenară.

La majoritatea virusurilor cu genom ADN, se disting două faze ale transcrierii: *timpurie* și *tardivă.*

O mică parte a genomului, este transcrisă în *ARNm timpuriu, necesar sintezei proteinelor precoce.* Cea mai mare parte a genomului este transcrisă ulterior, în *ARNm tardiv.* Cele două etape ale transcrierii sunt separate în timp, de momentul *replicării genomului viral.* ARNm timpuriu și ARNm tardiv sunt transcrise de pe catenele genomice opuse.

Reglarea cantitativă a sintezei proteinelor timpurii și tardive se face post-transcriere, prin intermediul *ARN antisens.*

În *faza timpurie* a infecției productive se acumulează preponderent copiile *catenei timpurii,* care sunt traduse în proteine timpurii.

În *faza tardivă* a ciclului de multiplicare, ARN polimeraza II transcrie copii multiple ale *catenei opuse întregi,* din care, prin clivare rezultă *ARNm tardiv* și moleculele de *ARN antisens.* Prin asocierea moleculelor de ARNm cu ARN antisens se formează ARN dc și astfel ARNm timpuriu este inactivat. ARN dc s-a identificat cu anticorpii specifici marcați cu fluorocromi, în celulele infectate cu adenovirusuri, HSV, poliomavirusuri, SV_{40} și cu virus vaccinal.

Dezoxiribovirusurile infecțioase pentru celulele eucariote, au *informație genetică discontinuă,* deoarece, pentru a face economie de informație genetică, secvențele codificatoare ale unei proteine (exoni) se înnădesc într-o succesiune alternativă. O secvență necodificatoare pentru sinteza unei proteine, va avea rol de exon pentru ARNm al altei proteine. Consecința directă este că transcrierea genelor se face, inițial, într-o moleculă de *ARN premesager,* ce va fi prelucrat ulterior de aparatul enzimatic al celulei. Copiile de ARNm sunt rezultatul unui proces de prelucrare prin clivare și înnădire alternativă (splicing). Ulterior sunt supuse altor modificări: adăugarea secvenței de poli-A (100-200 de resturi) la capătul 3' și *metilarea* capătului 5' (bonetare). Bonetarea este esențială pentru stabilirea interacțiunii ARNm viral cu subunitatea ribosomală 40 S.

Prelucrarea ARNm al dezoxiribovirusurilor este catalizată de enzimele celulare. Atât transcrierea cât și prelucrarea ARNm au loc în nucleu.

La poxvirusuri, transcrierea ARNm este catalizată de o *ARN-polimerază* proprie virionului și procesul are loc în citoplasmă.

Moleculele de ARNm sunt *monocistronice* (conțin informația genetică pentru sinteza unei singure proteine).

La dezoxiribovirusuri, transcrierea și traducerea informației genetice sunt evenimente *separate spațial și temporal*: transcrierea are loc în nucleu, iar sediul traducerii este citoplasma. Fac excepție poxvirusurile, la care transcrierea ARNm și traducerea au loc în citoplasmă.

18.3.2. Originea ARNm la ribovirusuri

La ribovirusuri, ARNm are origini diferite în funcție de tipul de virus, de natura genomului său (ARN mono- sau dublu catenar), dar în special în funcție de *polaritatea* materialului genetic.

Polaritatea acizilor nucleici este stabilită convențional, în raport cu posibilitatea traducerii lor directe sau indirecte, în proteine. ARN genomic, tradus direct în proteine, fără să necesite o etapă prealabilă de transcriere este considerat a avea *polaritate (complementaritate) pozitivă*. ARN genomic, care este mai întâi transcris într-o moleculă de ARNm complementar are *polaritate negativă* (fig. 380).

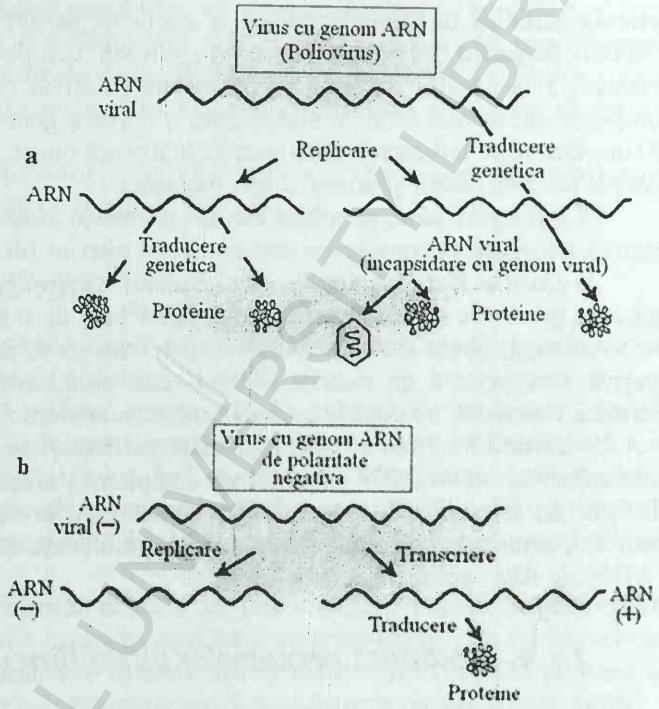


Fig. 380. Transcrierea și traducerea informației genetice la virusuri: (a) cu genom de polaritate pozitivă; (b) cu genom de polaritate negativă.

În ciclul de multiplicare a ribovirusurilor, nu se face distincția funcțională între ARNm timpuriu și tardiv, deoarece genomul viral funcționează alternativ ca matriță pentru sinteza ARNm și a ARN genomic.

După natura ARN genomic și după raportul său cu ARNm, ribovirusurile infecțioase pentru celulele animale, pot fi împărțite în 6 clase:

– *clasa I* cuprinde familiile *Picorna-, Togaviridae*, toți fagii ARN, cu genom de polaritate pozitivă, adică are rol *de ARNm* și codifică sinteza proteinelor structurale și funcționale. Genomul acestor virusuri este infecțios, pentru că funcționează direct ca ARNm pentru sinteza întregului set de proteine, inclusiv a ARN-polimerazei, care catalizează replicarea genomului viral. Virusurile cu genom de polaritate pozitivă au genom de dimensiuni mici.

Coronavirusurile au particularitatea că genomul lor, cu polaritate pozitivă, este transcris inițial de ARN-polimeraza virală, într-o copie de sens negativ, de aceiași lungime. Catena negativă, la rândul ei, este transcrisă în ARNm monocistronic, de diferite lungimi;

– virusurile *clasei a II-a* (*Paramyxo-, Rhabdo-, Filoviridae,* virusuri viscerotrope – Marburg, Ebola) au genom de *polaritate negativă*. Genomul lor antimesager nu funcționează ca ARNm și nu este tradus și nici transcris de celulă. Virionul conține o transcriptază proprie, *ARN-polimeraza dependentă de ARN*, care transcrie genomul de sens negativ, în ARNm monocistronic. Transcrierea este inițiată la un singur *promotor**, dar ARN-polimeraza recunoaște *secvențele semnal* și la sfârșitul fiecărei gene, este eliberată copia de ARNm *monocistronic*.

*Promotorii sunt secvențe de ADN care reglează expresia regiunilor codificatoare adiacente.

– virusurile ***clasei a III-a*** (*Myxoviridae*) au *genom segmentat*, monocatenar, cu *polaritate negativă*. Fiecare segment genomic este transcris în propriul său mesager. Fiind de polaritate negativă, transcrierea catenei genomice în ARNm este catalizată de o *ARN-polimerază* dependentă de ARN, existentă în virion, analogă funcțional cu enzima de transcriere a altor ribovirusuri cu catena genomică ARN de polaritate negativă. ARN-polimerazele virusului influenza sunt defective din punct de vedere funcțional: nu inițiază sinteza ARNm și nici nu-l modifică prin bonetare sau metilare internă. Aceste funcții sunt suplinite de ARN-polimeraza II a celulei, cea care catalizează inițierea sintezei și metilarea ARNm celular. Toate virusurile cu genom de polaritate negativă sunt învelite;

– ***clasa a IV-a*** (*Arenaviridae*), au genom ARN monocatenar, format din *două segmente*. Particularitatea sa funcțională constă în aceea că *jumătatea 3'* a fiecărui segment genomic are o *polaritate negativă* și este transcrisă în ARNm complementar, de o transcriptază virionică, iar jumătatea 5' a fiecărui segment are polaritate pozitivă. Pentru jumătatea 5', ARNm rezultă după o transcriere dublă: mai întâi se sintetizează o copie a genomului și ulterior, aceasta este transcrisă în ARNm. Deoarece informația este înscrisă în direcții opuse în cele două jumătăți ale fiecărui fragment, strategia de codificare a genomului este *ambisens*.

La *Bunyaviridae*, genomul este de asemenea ambisens, deoarece atât ARN genomic (de sens negativ), cât și catena complementară transcrisă ulterior (de sens pozitiv), funcționează ca ARNm;

– ***clasa a V-a*** (*Reoviridae*) au genomul *ARN dublu catenar, segmentat*. Fiecare din cele 10 segmente genomice este transcris separat la ARNm, de o transcriptază a virionului. Transcrierea este *conservativă*, deoarece catenele genomice parentale nu se separă și numai catena de complementaritate negativă funcționează ca matriță. ARNm este monocistronic. ARN genomic rămâne în regiunea centrală a virionului, iar copiile complementare sunt eliminate prin capsida parțial dezintegrată.

– ***clasa VI-a*** (*Retraviridae*) prezintă particularitatea că genomul lor se replică printr-o *copie intermediară de ADN*. ARN genomic are complementaritate pozitivă, dar nu funcționează ca ARNm. ARN pur nu este infecțios pentru că replicarea sa este dependentă de *revers-transcriptaza* asociată virionului, care transcrie ARN genomic într-o moleculă de ADN. ARNm este transcris din molecula de ADN, de ARN-polimeraza II celulară.

18.4. Biosinteza proteinelor virale timpurii

Sinteza proteinelor cu specificitate virală este evenimentul esențial al ciclului de multiplicare virală și necesită existența unui mesaj viral generat în etapa transcrierii. Sinteza proteinelor virale semnifică traducerea unui mesaj străin celulei și este supusă unor restricții.

O restricție majoră a sintezei proteinelor virale derivă din faptul că în celula infectată, exprimarea genelor virale este în competiție cu activitatea numeroaselor gene celulare funcționale. O singură copie a genomului viral, inițiază programul de dominanță asupra programului celular, de 10^4–10^6 ori mai mare, care este deja exprimat. Mesagerii virali sunt în competiție, pentru traducere, cu mesagerii celulari.

Proteinele virale sunt sintetizate de aparatul celular de sinteză proteică (aminoacizi, ARNt, ribosomi, enzimele catalizatoare).

Aparatul de sinteză proteică al celulei traduce numai mesaje unitare și nu recunoaște situsurile multiple de inițiere a traducerii unui ARNm viral policistronic. La unele virusuri, *ARNm este policistronic*, copie a câtorva gene și este tradus într-o *poliproteină* gigantă, clivată ulterior în proteine individuale de mărime adecvată. *Proteazele cu rol în prelucrarea poliproteinei par a fi de origine celulară și virală.* Poliproteina nu se evidențiază la electroforeză în gel de poliacril-amidă, deoarece este clivată chiar în timp ce se sintetizează. Inhibiția clivajului, prin încorporarea analogilor aminoacizilor, sau prin creșterea temperaturii, face posibilă detectarea ei la electroforeză.

Proteinele virale se sintetizează pe *polisomii* citoplasmatici. Pentru virusurile care se multiplică în nucleu, proteinele sintetizate în citoplasmă trebuie să fie transportate în nucleu, pentru a-și îndeplini funcția specifică: enzime de replicare a genomului sau proteine virale structurale.

Proteinele virale precoce aparțin următoarelor categorii:

1) *Proteine de reglare* cu rol de instituire și menținere a ordinii virale. Ele inhibă sinteza macromoleculelor specifice celulei, prin modificarea specificității sistemelor enzimatice de replicare,

transcriere şi traducere, astfel încât sintezele macromoleculare ale celulei sunt stopate şi metabolismul este orientat în sensul sintezei constituienţilor virali. Proteinele virale cu rol în controlul expresiei genelor sunt multifuncţionale;

2) *Proteine matriceale* cu rolul de a delimita viitoarea "fabrică de virus", adică teritoriul celular în care se multiplică virusul;

3) *Proteine-enzime* de tipul polimerazelor: ADN- şi ARN-polimeraza, nucleaze (enzime de clivare), ligaze, proteaze. Virusurile codifică *serin-proteaze, cistein-proteaze* şi *aspartic-proteaze*, dar nu codifică metaloproteaze. *Serin-proteazele* au un rest de *Ser* reactivă (grupul –OH) la situsul activ, care împreună cu *Asp* şi *His* formează triada catalitică, ce clivează legăturile peptidice. *Cistein-proteazele* au o diadă catalitică formată din resturi de *Cys* şi *His*. Ambele categorii formează intermediari *enzimă-substrat*. *Aspartic-proteazele* virale sunt asemănătoare cu omologele lor celulare (pepsina, gastrina, catepsina D, renina), în general sunt active la pH acid şi nu par să formeze intermediari enzimă-substrat.

Cele mai multe virusuri, în faza timpurie exprimă o cantitate foarte limitată de informaţie genetică. Numai poxvirusurile exprimă 30-50 de funcţii în faza precoce.

18.5. Replicarea genomului viral

În etapa timpurie se sintetizează proteine virale cu rol enzimatic, care condiţionează procesul replicării virale şi implicit, evoluţia complexului virus-celulă gazdă.

Pentru replicarea ADN viral sunt utilizaţi precursorii din mediul de creştere a celulelor, deoarece ADN celular nu este degradat. Celula sintetizează nucleotide, din care se sintetizează acizii nucleici virali. Procesul replicării genomului viral a fost studiat prin tehnica *autoradiografiei*, ce constă în adăugarea în mediul nutritiv, a precursorilor nucleotidelor, marcaţi radioactiv şi detectarea lor ulterioară în ADN viral. Replicarea genomului viral ADN este dependentă de acţiunea catalitică a unei ADN-polimeraze.

Virusurile mici utilizează ADN-polimeraza celulară, iar cele complexe (adeno, herpes), codifică sinteza ADN-polimerazelor proprii. Virusurile herpetice codifică 7 proteine-enzime, cu rol în replicarea genomului. Virusurile ADN se multiplică numai în celulele care se divid. Unele codifică proteine care induc intrarea celulei în stare de diviziune, iar cele complexe codifică multe proteine necesare replicării.

Replicarea ADN viral se face după modelul semiconservativ. Mecanismul replicării s-a studiat la toate familiile de dezoxiribovirusuri.

18.5. Replicarea genomului viral ADN

Pentru replicarea ADN, uneori, rolul de primer revine unei proteine legată la capetele 5'. La genomul linear, originile replicării sunt localizate în SRI de la extremităţi. La *adenovirusuri*, genomul este o moleculă dublu catenară, lineară, de 2000–2500 kDa (circa 36 kbp), cu *secvenţe repetate invers*, lungi de 100–140 nucleotide, la ambele extremităţi ale celor două catene (secvenţa de baze la un capăt al unei catene (de exemplu 5') este repetată în ordine inversă pe catena opusă, în acelaşi sens (5'–3'). Ele permit circularizarea moleculelor monocatenare care apar în timpul replicării (fig. 381). La cele două capete 5', catenele genomice sunt asociate covalent cu o *proteină de 55 kDa*.

Deşi celula ar putea replica ADN viral, cele mai multe virusuri ADN codifică propriile ADN-polimeraze, probabil pentru o eficienţă superioară. Replicarea ADN este *semiconservativă* şi *asimetrică*. Asimetria constă în faptul că numai una dintre catene este copiată într-o catenă complementară.

Replicarea este iniţiată la capătul 3' al unei catene genomice parentale, la care se ataşează complexul ADN-pol şi o proteină de 80 kDa, precursoare a proteinei (pTP) de 55 kDa de la capătul 5'. Proteina pTP de la capătul 3' are rol de *primer*. Sinteza ADN începe cu adăugarea dCMP (deoxicitidin-monofosfat), la proteina primer, formând o legătură esterică. ADN-polimeraza* alungeşte catena ADN în sensul 5' – 3', prin polimerizare succesivă la capătul 3'.

*ADN-polimeraza nu iniţiază sinteza *de novo* a unei catene de ADN, având nevoie totdeauna de un *primer*, ci alungeşte o catenă preexistentă. De obicei, primerul este un fragment de ARN complementar faţă de una dintre catene. Ulterior, secvenţa de ARN este înlocuită cu una de ADN.

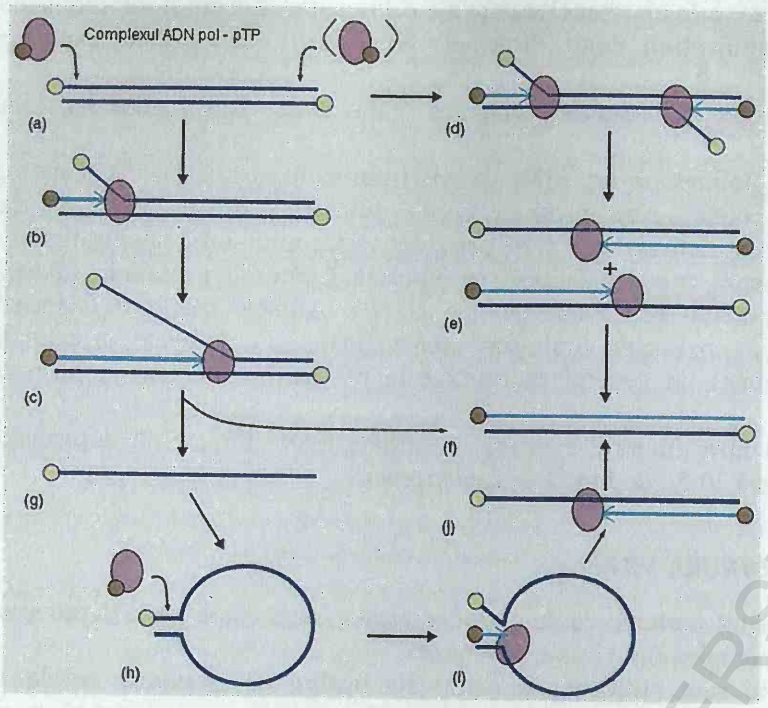


Fig. 381. Schema generală a replicării ADN la adenovirusuri. Linia de nuanță închisă reprezintă ADN parental. Linia de nuanță deschisă semnifică noua catenă de ADN. Săgețile pe catenele noi marchează capătul 3'. Cercurile de nuanță deschisă reprezintă proteina terminală (PT) atașată la capătul 5' al catenei parentale, iar cercurile de nuanță închisă semnifică precursorul proteinei terminale (pPT), cu rol de primer pentru sinteza noilor catene ADN. Ovalul reprezintă ADN-polimeraza. *a.* Complexul ADN-pol-pPT se asociază cu molecula genomică dublu-catenară. *b, c.* O singură catenă genomică este dislocată în direcția 5' – 3', iar catena 3' are rol de matriță pentru catena nouă *d.* Ambele catene ale moleculei parentale, concomitent, au rol de matrițe pentru sinteza noilor catene. *e.* Cele două catene matrițe, împreună cu catenele nascente se separă. *f.* Sinteza catenei noi este completă. *g, h.* Catena parentală se circularizează prin împerecherea bazelor din secvențele terminale repetate invers. *i.* Catena circulară are rol de matriță pentru sinteza unei catene noi (după K. N. Leppard, 2008).

Catena se alungește în direcția 5'–3' pe catena matriță și nu necesită fragmente Okazaki. Catena nascentă deplasează catena preexistentă de aceiași polaritate și împreună cu catena matriță de polaritate opusă, formează o moleculă dublu catenară.

Catena deplasată are rol de matriță pentru sinteza unei catene complementare. După același mecanism se formează o moleculă dublu-catenară, lineară.

Virusurile din grupul Papova au genomul format dintr-o moleculă de ADN dublu catenară, circulară. Replicarea moleculei circulare se realizează după *modelul semiconservativ, bidirecțional* și este simetrică. După același mecanism se replică ADN bacterian, precum și ADN din organite (mitocondrii, cloroplaste).

Replicarea este precedată de despiralizarea celor două catene, ca rezultat al inciziei succesive. Inciziile sunt reparate rapid după ce s-a produs despiralizarea.

Enzimele care incizează și repară rapid breșele moleculei de ADN se numesc topoizomeraze. Rolul lor este acela de a relaxa ADN supraspiralizat în sens pozitiv sau negativ. Ele produc modificări ale conformației spațiale (topologice) a moleculei de ADN, prin modificarea gradului de spiralizare.

Virusurile *Papova* nu au topoizomeraze proprii, ci utilizează enzimele celulare.

Replicarea moleculei circulare începe la un punct fix, denumit *originea replicării*, iar punctul în care catenele moleculei parentale se separă și sunt sintetizate catenele noi se numește *bifurcație de replicare.*

De la origine, bifurcația de replicare se deplasează cu foarte puține excepții, în ambele direcții ale moleculei circulare. Din această cauză, o moleculă de formă circulară, în cursul procesului de replicare are aspectul literei grecești theta (θ), iar mecanismul de replicare se numește *theta.*

Rezultatul replicării este o pereche de molecule circulare, denumite *catenani.* Catenarea este procesul de legare a două molecule circulare de ADN într-o structură supramoleculară, iar *decatenarea* este procesul invers, de separare a celor două molecule.

La *herpesvirusuri*, genomul este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, de 150 kbp. Molecula este alcătuită din *două domenii* cu secvență unică: unul mai mare, notat cu *L* (*L*arge) și altul mai scurt, *S* (*S*hort).

La *Herpes simplex virus* (HSV), fiecare secvență este flancată la extremități, de câte o secvență de nucleotide repetate în ordine inversată (SRI), de câte 300-400 de baze. O particularitate a genomului HSV este orientarea întâmplătoare a celor două secvențe unice, astfel încât într-o populație de virioni se găsesc simultan cele 4 variante de genom linear: *P* (*P*rototip), *IL* (*I*nverted *L*), *IS*

(*Inverted S*) şi *ISL* (Inverted *S* şi *L*). Ele apar ca o consecinţă a asocierii aleatorii în oricare dintre cele două orientări a celor două domenii genomice (fig. 382).

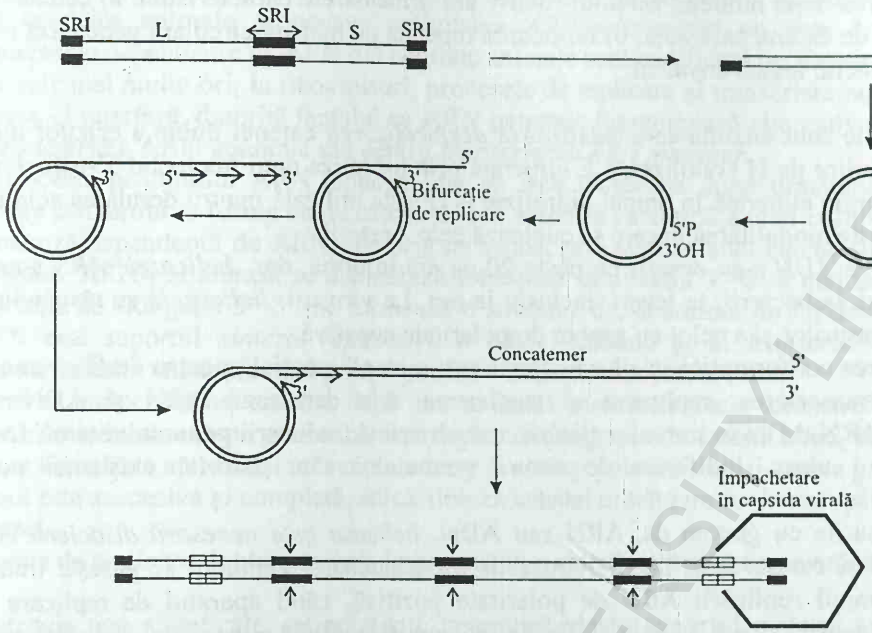


Fig. 382. Reprezentarea schematică a replicării genomului la herpesvirusuri după modelul literei sigma (σ).

Replicarea genomului se face prin intermediul moleculelor circulare. După ce ADN viral ajunge în nucleul celulei, secvenţele terminale repetate în ordine inversă (SRI) sunt supuse acţiunii limitate a unei *exonucleaze*, la nivelul uneia dintre catene. Secvenţele rămase se împerechează, formând o moleculă circulară, dublu catenară, covalent închisă.

Într-o primă etapă, replicarea moleculei circulare se face ciclic, după modelul semiconservativ al *cercului simplu*. Ulterior, moleculele circulare generate în prima etapă a transcrierii se replică după modelul *cercului rotativ*. Un rol esenţial în procesul de replicare îl au *helicazele*.

Una dintre catenele moleculei circulare (catena leading*) este incizată la un situs specific, sub acţiunea unei endonucleaze virale şi rezultă două capete libere: 3'OH şi 5'P. Cealaltă catenă rămâne circulară, închisă covalent.

La capătul 3' al catenei incizate (catena "leading") este iniţiată sinteza replicativă. Capătul 3'OH are rol de *primer* şi creşte prin polimerizarea nucleotidelor, catalizată de ADN-polimeraza. Catena circulară funcţionează ca *matriţă rotativă*.

Polimerizarea are loc totdeauna, prin alungirea unei catene primer în direcţia 5'–3', începând de la capătul 3'OH al catenei incizate. Când bifurcaţia de replicare a parcurs cel puţin odată catena circulară cu rol de matriţă şi catena incizată (leading*) este de două ori mai lungă în raport cu momentul iniţial, ea poate fi copiată în sens invers, pe calea replicării discontinue a *fragmentelor Okazaki*, de un alt complex enzimatic de replicare. Astfel, molecula nou sintetizată devine dublu catenară.

* Catena "leading"(*to lead*, lb. engleză = a conduce) este cea care expune capătul 3'OH liber şi este transcrisă într-o catenă complementară continuă în direcţia 5'–3'.

Catena leading continuă să se rotească pe matriţa circulară, fiind copiată succesiv. Se formează astfel mai multe molecule concatemere, în tandem, în conexiune cap-coadă.

Rezultatul intermediar al replicării este un cerc cu o ramificaţie laterală, care se aseamănă cu litera grecească *sigma* (σ) şi de aceea, replicarea după modelul cercului rotativ se numeşte *replicare sigma*.

Concatemerul poate fi separat de molecula circulară prin clivare, sub acţiunea unor *endonucleaze*. La rândul lor, capetele catenei incizate ale moleculei circulare sunt reunite sub acţiunea unei *ligaze* şi se reface continuitatea covalent închisă a structurii circulare dublu catenare.

DUAL CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În procesul morfogenezei virale, concatemerii lineari sunt clivați în molecule dublu catenare lineare, de lungimea genomului.

Replicarea după modelul cercului rotativ are următoarele caracteristici: a) catena leading este legată covalent de catena parentală; b) replicarea repetată pe matrița circulară generează o ramificație laterală concatemeră, legată covalent.

Helicazele sunt enzime care catalizează *despiralizarea* catenei duble a acizilor nucleici, prin disocierea legăturilor de H și utilizează E eliberată prin hidroliza unui nucleotid 5'-trifosfat (NTP), de obicei ATP. Energia eliberată în timpul hidrolizei NTP este utilizată pentru derularea acidului nucleic, deși nu se cunoaște modalitatea în care se cuplează cele 2 reacții.

Helicazele ADN s-au descris cu peste 20 de ani în urmă, dar *helicazele ARN* s-au evidențiat recent la virusuri, la bacterii, la levuri, inclusiv la om. La virusuri, *helicazele* au răspândire largă, cu excepția retravirusurilor și a celor cu genom de polaritate negativă.

Modularea conformației acizilor nucleici este o etapă esențială pentru desfășurarea proceselor fundamentale: transcrierea, replicarea și traducerea. Ele derulează ARN și ADN dc, dar și heteroduplexul ARN-ADN în timpul replicării, transcrierii și traducerii genomului viral. Helicaza ar fi necesară oricărui virus, indiferent de natura genomului său, datorită existenței nucleotidelor complementare.

La virusurile cu genom dc, ARN sau ADN, *helicaza este necesară disocierii catenelor în timpul replicării și transcrierii.* La ribovirusurile monocatenare, genomul se găsește tranzitoriu sub formă dc: în timpul replicării ARN de polaritate pozitivă, când aparatul de replicare trebuie să funcționeze, iar matrița liberă trebuie să fie permanent disponibilă pentru un nou ciclu de replicare. Rolul helicazei ar fi acela de a *disocia* perechile intramoleculare de baze și de a preveni formarea perechilor extinse între matrice și catena complementară nascentă. Virusurile cu genom mai mic de 5,8 kb nu codifică helicaza.

Funcțiile helicazei:

- helicazele ar putea fi implicate în controlul fidelității replicării (funcția "proof reading");
- pentru inițierea precoce a replicării și prevenirea formării perechilor între catena de ARN nascent și catena matriță (ARN sau ADN);
- pentru inițierea traducerii, facilitând legarea de subunitatea 40 S a ribosomului.

Testul helicazei. Testul clasic folosește un substrat ARN susceptibil de derulare, alcătuit din 2 catene ARN complementare, dintre care una este marcată radioactiv. Substratul este incubat cu proteina cercetată pentru activitatea de helicază, în prezența NTP și Mg^{2+}. Produsele reacției se separă prin EF pe un gel denaturant. ARN mc migrează mai rapid decât cel dc și catena deplasată se observă direct. Catena mai lungă este considerată convențional, ca matriță, iar cea scurtă este catena în curs de sinteză.

Retravirusurile folosesc o helicază celulară pentru a derula ARN sintetizat de pe matrița de ADN integrat.

Parvovirusurile au ca genom o moleculă de ADN monocatenară, lineară. Capetele moleculei au secvențe palindromice*, repetate în ordine inversă, care formează "bucle în ac de păr". Regiunile palindromice terminale reprezintă 5% din genom și sunt esențiale pentru replicarea acestuia, deoarece constituie secvențele primer pentru acțiunea catalitică a ADN-polimerazei. Replicarea este catalizată de aparatul enzimatic al celulei.

* Palindromul este o succesiune de baze, simetrică față de un punct central, astfel încât secvența bazelor este aceiași atât în sensul 3' --- 5', cât și în sensul 5' --- 3'.

Într-o primă etapă, genomul monocatenar este convertit la forma dublu catenară, prin împerecherea bazelor complementare, denumită *intermediar de replicare.*

Intermediarul dublu catenar este incizat într-o poziție opusă situsului de inițiere pentru sinteza catenei complementare și generează un capăt 3'OH, de la care secvența repetitivă este alungită pe catena complementară cu rol de matriță. Se sintetizează astfel, catene multiple cu polaritate genomică (pozitivă). Catenele nou sintetizate, cu polaritate genomică, rămân în configurație lineară și constituie genomul virionilor progeni sau se replică după același mecanism, amplificând rata sintezei catenelor genomice.

18.6. Replicarea şi transcrierea genomului viral ARN

Replicarea şi transcrierea ARN viral sunt catalizate de ARN-pol dependentă de ARN. În citoplasma celulelor animale şi umane, activitatea *ARN-polimerazei* nu este detectabilă. Toate ARN-polimerazele dependente de ARN din celulele animale sunt codificate de ribovirusuri.

De cele mai multe ori, la ribovirusuri, procesele de replicare şi transcriere nu sunt separate în timp şi spaţiu, ci interferă, datorită faptului ca ARN genomic funcţionează alternativ ca matriţă pentru *copierea replicativă* a ARN genomic sau pentru *transcrierea ARN mesager.*

Replicarea genomului ARN monocatenar se face totdeauna după următorul model: catena genomică este convertită la forma dublu catenară, sub acţiunea catalitică a unei enzime de replicare (o ARN-polimerază dependentă de ARN), de origine virală, prin sinteza unei catene complementare de aceiaşi lungime. ARN-polimeraza se deplasează totdeauna în direcţia 3'–5' a matriţei şi sintetizează ARN în direcţia de elongaţie 5'–3'. Se formează o structură dc, denumită *formă de replicare.* Forma dc de ARN este suportul *sintezei replicative* a ARN genomic şi al *transcrierii ARNm.* ARN-polimeraza nu necesită existenţa unui primer pentru a iniţia sinteza catenei noi.

Sinteza noilor catene are loc după mecanismul *semiconservativ asimetric.* Din forma de replicare dublu catenară, catena genomică este deplasată progresiv de catena nouă, în curs de sinteză. Catenele nou sintetizate au aceiaşi secvenţă de baze şi aceiaşi polaritate ca şi catena genomică. Sinteza catenelor noi este succesivă şi completă, adică sinteza catenei următoare nu începe până ce precedenta nu s-a eliberat.

Forma de replicare dublu catenară, împreună cu o catenă nascentă formează un *intermediar de replicare.*

Catenele nou sintetizate, cu polaritate genomică, devin suportul sintezei replicative sau se asociază cu proteinele capsidale.

La virusurile care au ca genom o catenă de ARN cu *polaritate pozitivă* (*Picorna-, Togavirus*), catena de sens pozitiv a formei dc este dislocată de catena nascentă a intermediarului de replicare, iar catena de *sens negativ* are rol de matriţă pentru sinteza copiilor de polaritate pozitivă, care îndeplinesc două roluri:

a) unele, după prelucrarea prin bonetare* (metilare la capătul 5'), metilare internă şi adenilare la capătul 3', au rolul de ARNm;

* Bonetarea sau capping (*cap*, lb. engleză = bonetă) semnifică o etapă a prelucrării post-transcriere a moleculei de ARNm, ce constă în adăugarea la capătul 5' a metil-G. "Bonetarea" este esenţială pentru interacţiunea moleculei de ARNm cu ribosomii în procesul traducerii informaţiei genetice.

b) altele funcţionează ca matriţe pentru sinteza unor catene noi, de polaritate negativă, amplificând rata sintezei ARN cu specificitate virală.

La virusurile cu *genom ARN de polaritate pozitivă*, deoarece ARN genomic funcţionează ca ARNm, ARN-polimeraza se sintetizează în celulă, după infecţie şi nu este componentă a virionului. Din această cauză, ARN genomic este infecţios (fig. 383).

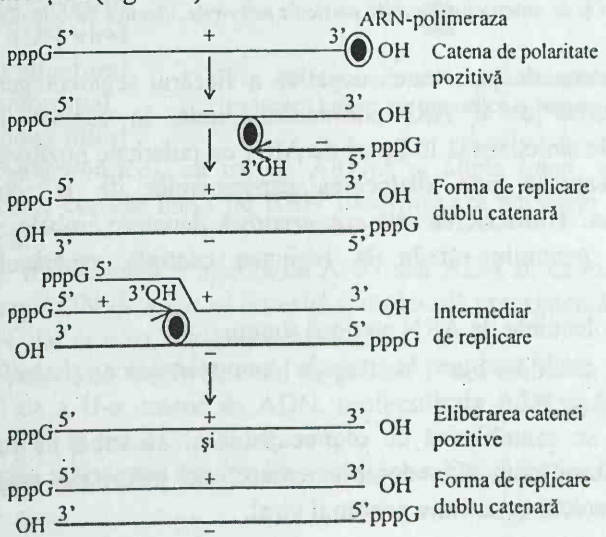


Fig. 383. Modelul replicării genomului viral ARN cu polaritate pozitivă.

BCU IAŞI / CENTRALA UNIVERSITARĂ

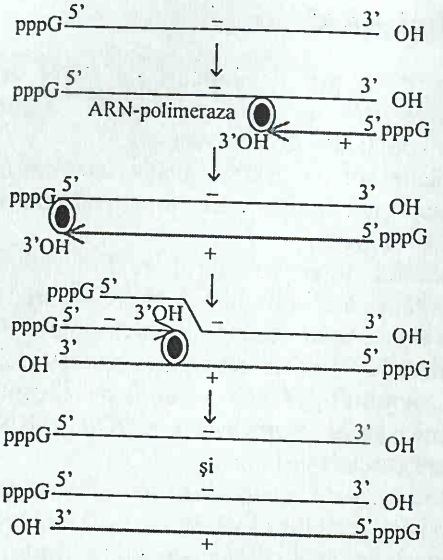


Fig. 384. Modelul replicării genomului viral ARN cu polaritate negativă.

La virusurile cu genom ARN de polaritate negativă (grupul *Mononegavirales*- paramixo-, rhabdo-, filovirusuri), mesagerii și catenele genomice sunt transcrise de pe matrițe diferite: catena de polaritate negativă a formei dublu catenare funcționează ca matriță pentru transcrierea *ARNm monocistronici*, iar cea de polaritate pozitivă este transcrisă în copii de *lungimea genomului* (fig. 384), de polaritate negativă, cu rol de ARN genomic. Replicarea se deosebește de transcriere prin modul în care progresează ARN-pol: continuu sau secvențial.

Virionul conține o transcriptază proprie – o ARN-polimerază dependentă de ARN, care catalizează sinteza catenei de ARN complementar și a ARNm. De aceea, ARN purificat al acestor virusuri nu este infecțios.

Virusurile cu genom ARN se multiplică în citoplasmă, cu excepția *virusurilor gripale*, la care, replicarea și transcrierea genomului au loc în nucleu. La mixovirusuri, transcrierea moleculelor cu rol de ARNm, ca și a celor genomice, este catalizată de aceiași ARN-polimerază virală, dar enzima este defectivă funcțional, deoarece alungește o catenă preexistentă, dar nu inițiază sinteza de novo*.

* Polimeraza PB_2 și proteina NS_1 clivează capetele 5' bonetate ale mesagerilor celulari, pe care polimeraza PB_1 le folosește ca primeri pentru sinteza replicativă și pentru transcrierea genomului viral. Altă explicație a dependenței de nucleu rezidă în aceea că mesagerii pentru sinteza proteinelor M_1 și M_2, respectiv NS_1 și NS_2 sunt prelucrați prin clivare și înnădire.

Unele copii de polaritate pozitivă, cu rol de ARNm sunt "bonetate" (capping), metilate și poliadenilate de enzime *celulare nucleare* și sunt transferate în citoplasmă, iar altele rămân în nucleu, cu rol de matriță pentru sinteza ARN genomic (de polaritate negativă), pe toată durata procesului infecțios.

Replicarea genomului ARN dublu catenar multipartit al reovirusurilor* (10 segmente) este simultană cu transcrierea (fig. 385).

* Reovirusurile se transmit pe cale orală și sunt prelucrate de proteazele digestive în lumenul intestinal. Dezvelirea implică parțial, digestia proteolitică a capsidei externe. Proteoliza nu inactivează virusul, ci remodelează capsida externă. Virusul este activat, după eliberarea proteinei majore δ3, clivajul proteinei μ1c și a HA δ1. Virusul prelucrat proteolitic aderă de *celulele M* și de enterocite. Rezultă particule subvirale, identice cu cele obținute *in vitro* sub acțiunea chimotripsinei.

Catena de polaritate negativă a fiecărui segment genomic este transcrisă de o ARN-polimerază virală, în capsida parțial deschisă. Se sintetizează 10 tipuri de ARN cu polaritate pozitivă, care părăsesc capsida prin dizlocarea capsomerelor de la vârfurile icozaedrului. Transcrierea este *conservativă,* deoarece ambele catene ale ARN genomic rămân în regiunea centrală, nedezvelită a virionului.

Moleculele de ARN au două funcții:

a) sunt traduse în mesaje monocistronice și astfel se sintetizează proteine virale;

b) se asamblează cu o precapsidă și au rolul de matrițe pentru sinteza catenelor complementare, de polaritate negativă. Catenele perechi constituie genomul viral.

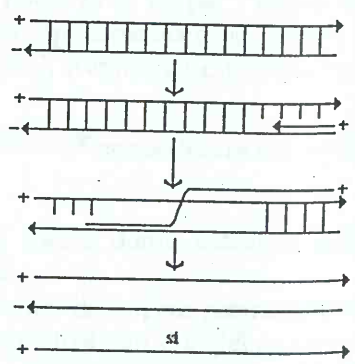


Fig. 385. Modelul replicării genomului ARN dublu catenar al reovirusurilor. Amănunte în text.

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ

18.6.1. Replicarea şi transcrierea ARN printr-un intermediar ADN

Replicarea ARN printr-un intermediar ADN este caracteristică *retravirusurilor*. Genomul lor este reprezentat de o catenă de ARN, care, în fiecare virion se găseşte în dublu exemplar, ceea ce conferă caracterul *diploid* al genomului acestor virusuri. Nu se cunoaşte modul de asociere fizică a celor două molecule de ARN.

Genomul ARN al retravirusurilor este replicat printr-un flux de informaţie genetică ce trece prin ADN, proces denumit *transcriere inversă*[*].

[*] Fenomenul a fost descoperit de H. Temin şi D. Baltimore (1970). Ei au tratat celulele infectate cu VSR, cu *actinomicina D*, un antibiotic care se inseră între bazele moleculei de ADN dc şi inhibă transcrierea. Antibioticul inhibă multiplicarea virusurilor ADN, nu influenţează multiplicarea ribovirusurilor obişnuite, dar inhibă multiplicarea retravirusurilor. Concluzia a fost că în ciclul lor de multiplicare există o fază sensibilă la actinomicina D, reprezentată de un intermediar ADN.

Singura funcţie a ARN genomic este de a îndeplini rolul de matriţă pentru sinteza intermediarului de ADN în celula infectată. Celula nu posedă o enzimă care să îndeplinească această funcţie. Virionul conţine o ADN-polimerază dependentă de ARN, denumită *revers-transcriptază* (RT), precum şi molecule de ARNt încorporate din celulă în procesul asamblării, care îndeplinesc rolul de *primer* al transcrierii inverse, deoarece ADN-polimeraza nu iniţiază sinteza unei catene noi, ci doar alungeşte una preexistentă (fig. 386).

Procesul transcrierii începe timpuriu, deoarece RT se activează imediat ce virusul a ajuns în celula sensibilă. Etapele replicării ARN viral sunt următoarele:

a) Legarea complexului molecular al RT, de ARN genomic viral;

b) Sinteza unei copii de ADN complementar, catalizată de RT, care rămâne legată prin punţi de H, de ARN genomic. Rezultă un hibrid molecular ARN-ADN;

c) Digestia selectivă a ARN genomic, din hibrizii moleculari ARN-ADN, sub acţiunea RN-azei H, sau chiar sub acţiunea RT;

d) Sinteza unei catene complementare de ADN viral. Astfel se formează o moleculă dublu catenară de ADN viral, care este translocată în nucleul celulei infectate şi se *integrează* covalent în structura unui cromosom al celulei. ADN viral este integrat stabil şi din punct de vedere structural nu se distinge de secvenţele de ADN cromosomal.

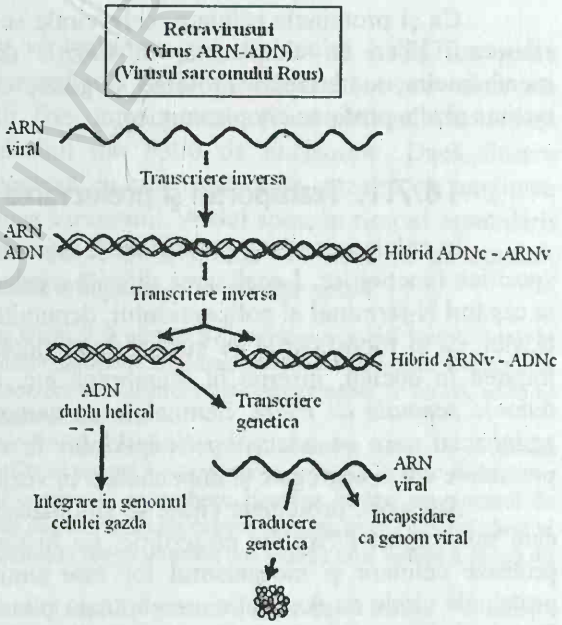


Fig. 386. Succesiunea etapelor transcrierii şi traducerii informaţiei genetice la retravirusuri.

ADN integrat este transcris în două tipuri de molecule de ARN: unele *scurte* (subgenomice), cu rol de ARNm şi altele *lungi*, cu funcţie genomică. La retravirusurile transductoare, copiile lungi de ARN încorporează secvenţe *oncogene* (protooncogene), derivate din celula gazdă.

Activitatea ADN-polimerazică a RT necesită o matriţă de ARN sau ADN şi, ca toate ADN-polimerazele cunoscute, nu iniţiază sinteza ADN *de novo*, ci necesită o moleculă preexistentă (primer). In *vitro*, primerul poate fi ARN sau ADN, dar *în vivo*, totdeauna este ARN.

Pentru sinteza catenei ADN de polaritate negativă, rolul de primer îl are molecula de ARNt, originară în celulă. Pentru sinteza celei de a II-a catene de ADN, molecula de ARN genomic este incizată la nivelul secvenţei polipurinice (PP) şi funcţionează ca primer.

Toate revers-transcriptazele, pentru activitatea *in vitro* au nevoie absolută de cationi bivalenţi: Mg^{2+} (10 mM).

Activitatea RN-azei H este inerentă în toate preparatele de revers-transcriptază. Ea hidrolizează ARN-genomic din hibridul ARN-ADN, pe măsura progresiei sintezei celei de a II-a catene de ADN.

18.7. Biosinteza proteinelor tardive

Categoria proteinelor tardive cuprinde pe acelea care se sintetizează după replicarea genomului viral. Ele sunt în primul rând, *proteine structurale,* necesare asamblării virionilor progeni şi se sintetizează cu o rată înaltă, prin transcrierea şi traducerea copiilor genomice multiple, rezultate prin replicare. De aceea, proteinele tardive se sintetizează în cantităţi mari, uşor detectabile pe imaginile electrono-optice sau la analiza electroforetică. De exemplu, în celulele infectate cu adenovirusuri, proteinele tardive se sintetizează în mare exces şi formează incluziuni mari, în care agregatele moleculare au o distribuţie ordonată, paracristalină. Alte proteine tardive au *rol funcţional*:

- *proteinele reglatoare*, al căror rol s-a demonstrat mai întâi pentru bacteriofagi, iar ulterior, pentru adeno- şi herpesvirusuri. Cantităţile de proteine necesare asamblării diferitelor structuri virale sunt foarte diferite şi proporţiile sintezei trebuie corelate direct cu necesarul;
- *proteine de morfogeneză*, necesare asamblării virusurilor cu structură complexă;
- proteine care uşurează *eliberarea* virionilor din celulă.

Pentru sinteza proteinelor tardive, virusurile folosesc aparatul celular de sinteză şi exploatează mecanismele celulare pentru transportul şi modificarea proteinelor traduse.

Ca şi proteinele celulare, cele virale se sintetizează pe ribosomii legaţi de membrane sau pe ribosomii liberi în citoplasmă, în funcţie de destinaţie. In celula normală, ribosomii asociaţi membranelor, sintetizează proteine şi glicoproteine de membrană, iar ribosomii liberi sintetizează enzime şi alte proteine citoplasmatice.

18.7.1. Transportul şi prelucrarea proteinelor

În celula eucariotă, proteinele şi acizii nucleici sunt transportaţi de la locul sintezei, la sediile specifice funcţiei lor. Localizarea diferită-a proteinelor este determinată de secvenţa de aminoacizi de la capătul N-terminal al polipeptidului, denumită *secvenţa semnal*, dar şi de alte secvenţe ale polipeptidului, ca şi modificările ce survin după sinteză. Toate orientează proteina spre diferite localizări: intrarea în nucleu, inserţia în membrană etc. Determinanţii care orientează destinaţia proteinei se numesc *semnale de triere*. Semnalele au caracter de specificitate şi constau din scurte secvenţe de aminoacizi care se adaugă polipeptidului în cisternele aparatului Golgi. In funcţie de destinaţie, proteinele vor fi segregate şi împachetate în vezicule separate.

Adeseori, proteinele virale se sintetizează sub forma unor precursori de dimensiuni mai mari, care sunt supuşi *clivajului* proteolitic, fie în timpul sintezei, fie ulterior. Clivările sunt catalizate de proteaze celulare şi mecanismul lor este similar cu acela al clivării proteinelor celulare. Astfel, proteinele virale cu destinaţie membranară pierd secvenţa N-terminală, înainte de terminarea sintezei. Proteinele structurale sunt, adeseori, clivate în timpul asamblării virionilor.

Glicozilarea proteinelor virale, consecutivă traducerii informaţiei genetice urmează acelaşi mecanism ca şi glicozilarea proteinelor celulare. Toate proteinele expuse pe suprafaţa învelişului sunt glicozilate, iar cele din structura nucleocapsidei nu sunt niciodată glicozilate. Catenele glucidice ale glicoproteinelor virale şi celulare, formate din 1–3 resturi, sunt *N-lincate* (C1 glucidic se leagă de NH_2 al restului de Asp printr-o legătură N-glicozidică) şi conţin secvenţa Man-GlcNac-GlcNac. Glicozilarea începe în timpul sintezei polipeptidului în *reticulul endoplasmic*.

Catenele glucidice *O-lincate* sunt legate prin intermediul C_1, de treonină şi serină, şi sunt adăugate totdeauna în *cisternele Golgi*. Diferitele zaharuri ale catenei oligozaharidice sunt adăugate secvenţial, fiecare reacţie fiind catalizată de o *glicozil-transferază* specifică de origine celulară.

Unele proteine virale sunt *fosforilate*. Ele interacţionează cu ADN şi au rol în replicarea ADN sau în transcriere. Altele sunt *acilate,* prin legarea covalentă a acizilor graşi.

Proteinele virale tardive sunt transportate la situsuri diferite în funcţie de sediul morfogenezei virionilor: o parte rămâne în celulă, iar o altă parte este transportată la nivelul membranei, având rol în procesul înmuguririi virale.

Glicoproteinele peplosului virusului gripal se sintetizează pe ribosomii asociaţi RE, sunt translocate în lumenul RE printr-un por proteic (translocon) şi intră în calea secretorie a celulei: migrează în cisternele golgiene şi se glicozilează sau suferă alte modificări (acilare cu acid palmitic sau miristic). Prin vezicule de transport, glicoproteinele sunt transportate la nivelul membranei şi se inseră pe faţa externă a acesteia. Proteina matriceală (M), neglicozilată, se agregă prin interacţiuni necovalente, pe faţa internă a membranei citoplasmatice, în zone distincte ("petice").

18.8. Asamblarea (morfogeneza) şi eliberarea virionilor

Studiul dinamicii asamblării virusurilor infecţioase pentru celula animală este îngreunat, pe de o parte, de complexitatea structurală a capsidei, iar pe de altă, de abundenţa componentelor moleculare ale mediului celular în care are loc asamblarea. Cunoştiinţele referitoare la mecanismele dominante ale asamblării virale sunt rezultatul studiilor morfogenezei fagilor şi a virusurilor infecţioase pentru plante.

Morfogeneza virală se supune principiului fundamental al *autoasamblării*[*], ca rezultat al faptului că fiind determinante de formă, capsomerele se pot asocia într-o modalitate unică.

[*] Autoasamblarea semnifică faptul că toată energia şi informaţia pentru asamblare sunt conţinute în monomerii individuali. Monomerii se asociază unul cu altul, într-o ordine determinată, într-o combinaţie de legături ionice, legături de H şi interacţiuni hidrofobe.

La virusurile cu simetrie helicală (de exemplu, virusul mozaicului tutunului – VMT), capsida se asamblează pe măsură ce capsomerele interacţionează cu ARN genomic. La acest virus s-a demonstrat pentru prima dată, existenţa unei relaţii fixe între genom şi capsomere, precum şi mecanismul autoasamblării. Genomul VMT este alcătuit din 6390 de nucleotide. Dacă fiecare capsomeră, în procesul morfogenezei capsidei se asociază cu trei nucleotide, rezultă că lungimea genomului viral, determină în mod obligatoriu, lungimea virionului. Altfel spus, în timpul asamblării virionului, capsomerele se aşează în jurul moleculei de ARN genomic. In absenţa genomului, capsomerele se asamblează în număr foarte mare, formând o capsidă imensă, dar goală.

La VMT, molecula proteică este în acelaşi timp, unitate chimică şi unitate structurală a capsidei (capsomera). In anumite condiţii de mediu (creşterea valorii pH), capsida se dezorganizează în capsomerele componente. Restabilirea condiţiilor de mediu, induce autoasamblarea capsidei cilindrice, deoarece capsomerele sunt determinante de formă, adică se pot asambla într-un singur mod, după principiul de construcţie a simetriei helicale.

Mecanismul autoasamblării capsidei VMT este următorul: iniţial se formează un complex stabil, de 17 unităţi proteice (capsomere), în formă de disc, aşezate într-un *strat unic*. Ele se agregă spontan pentru a forma un disc alcătuit din două straturi ce conţin 34 capsomere. Fiecare strat al discului conţine 17 capsomere, aproape acelaşi cu numărul de capsomere (16,3), într-un tur al helixului VMT. Discul alcătuit din *două straturi* de capsomere este intermediarul cheie al asamblării VMT. O proprietate importantă a discului este că subunităţile pot să alunece una faţă de altă, pentru a forma un helix cu două tururi.

Discul, alcătuit din două tururi de capsomere, interacţionează cu ARN genomic. Asamblarea începe prin inserţia buclei de iniţiere a genomului (secvenţa de împachetare), în spaţiul liber din centrul discului proteic. Discul proteic recunoaşte specific secvenţa de împachetare a genomului. Cu excepţia secvenţei de împachetare, care iniţiază procesul asamblării, proteinele capsidei şi ARN genomic interacţionează nespecific. Prin interacţiunea lor, nu se formează legături covalente noi, ci numai legături secundare slabe. Ca dovadă a interacţiunii laxe, atât între capsomere, cât şi între capsomere şi ARN, capsida se disociază prin creşterea valorii pH.

Virionul este complet asamblat după ce este acoperit capătul 5' al genomului.

În general, virionii cu *structură complexă* se asamblează gradat din ansambluri distincte, construite din subunităţi proteice, ce se formează spontan prin autoasamblarea moleculelor proteice individuale.

În esenţă, asamblarea virionilor cu simetrie icozaedrică, este rezultatul a două procese ce se desfăşoară succesiv sau aproape simultan:

– *asamblarea proteinelor* structurale în *capsomere* şi a acestora în *structura capsidei*. La virusurile complexe, capsomera ca unitate de construcţie este alcătuită din câteva molecule proteice;

– *asocierea capsidei cu acidul nucleic* genomic. Poate fi asamblată o structură capsidală goală, în care ulterior pătrunde ADN sau împachetarea ADN este concomitentă cu asamblarea capsidei.

La *ribovirusurile nude, cu simetrie icozaedrică*, asamblarea capsidei şi asocierea ei cu ARN sunt procese aproape concomitente, datorită instabilităţii ARN viral în celulă.

La *virusurile ADN cu simetrie icozaedrică* (adeno-, herpetice), ansamblurile proteice pot forma o structură goală, matură, denumită *precapsidă*, înainte de a se asocia cu genomul. Interacţiunea genomului viral (ADN sau ARN), cu proteinele capsidale şi rolul acestor interacţiuni în împachetarea genomului rămân necunoscute. În capsidă este împachetat, de regulă, numai ARN genomic, ca dovadă a existenţei unei secvenţe de împachetare (identificată la ARN Sindbis – un alfavirus).

În procesul asamblării capsidelor cu simetrie icozaedrică, participă proteinele de "cofraj". Ele au probabil, nu numai un rol *mecanic*, ci şi *catalitic* în realizarea unor interacţiuni stabile ale moleculelor componente. După asamblarea capsidei şi consolidarea interacţiunilor între capsomere, proteinele de "cofraj" sunt eliminate din structura virionului.

La reovirusuri, segmentele genomice de ARN dublu catenar se asamblează cu o proteină de morfogeneză şi formează regiunea centrală a virionului, pe suprafaţa căreia se asamblează capsida.

Virusurile, dar în special cele învelite (HIV, pox-, herpesvirusuri), au un mare potenţial de a îngloba proteine ale celulei gazdă, atât în peplos, cât şi în structurile subiacente, dar nu li se cunoaşte semnificaţia funcţională.

Studiul ultrastructural al multiplicării *virusului vaccinal* a relevat procesul stadial complex al morfogenezei, cu participarea cisternelor aparatului Golgi, care formează învelişul extern al virionilor. În citoplasma celulelor infectate apar zone difuze sau bine delimitate alcătuite din material fin-granular, denumite *viroplasmă*, în interiorul cărora se asamblează virionii progeni. Procesul asamblării, complex şi incomplet elucidat, comportă edificarea *de novo* a unor structuri *membranare* destinate să înglobeze o parte din materialele viroplasmei.

Creşterea, turnover-ul şi repararea membranelor se face prin intercalarea componentelor structurale (proteine, lipide) în structurile preexistente. Biogeneza *de novo* a membranelor rămâne una dintre marile probleme ale biologiei. Pentru virusurile pox, există dovada structurală că unele componente ale învelişului, sintetizate sub control viral, încep să se condenseze în membrane. Membranele sunt asamblate în focare viroplasmice discrete şi rămân separate de membranele celulare.

Membranele virale sintetizate *de novo* sunt detectabile în matricea viroplasmei şi au structură trilaminară, fiind tapetate la exterior de un strat dens de spiculi. Pe măsură ce membranele cresc, ele înconjură ADN nascent şi proteinele acumulate în viroplasmă.

Eliberarea virionilor din celulă se face prin mai multe mecanisme, dependente în primul rând, de natura virusului.

Virusurile nude se eliberează rapid după *moartea şi liza celulei*. Într-o mică măsură, virusurile nude (cu genom ARN sau ADN) se eliberează prin modificarea permeabilităţii membranei citoplasmatice.

Majoritatea virusurilor *învelite* (mixo-, paramixo, toga-, retravirusuri) se eliberează prin *înmugurire* din membrana citoplasmatică sau în cisternele RE granular (flavivirusuri), în cisternele Golgi sau în membrana nucleară. Ultimele etape ale asamblării nucleocapsidei sunt asociate cu primele stadii ale înmuguririi, sau asamblarea capsidei precede înmugurirea (de exemplu, particulele de tip B şi D ale retravirusurilor). Inmugurirea are loc la nivelul unor situsuri specifice ale membranei celulare, acolo unde proteinele virale s-au inserat, atât pe faţa internă cât şi pe cea externă a membranei plasmatice sau a membranelor reticulului endoplasmic. Asamblarea prin înmugurire necesită co-localizarea componentelor structurale (fig. 387). Virusurile care înmuguresc prin membrana plasmatică conţin fosfolipide şi colesterol în proporţii caracteristice membranei, iar cele care înmuguresc în cisternele RE au colesterol în proporţie foarte mică.

Proteinele care proemină pe suprafaţa externă a membranei sau în cisternele reticulului endoplasmic, sunt glicozilate, iar cele care tapetează faţa internă a membranei citoplasmatice sunt neglicozilate. Glicoproteinele virale se inseră în zone distincte ale membranei, din care proteinele celulare sunt dislocate sau chiar înlocuite. Nucleocapsidele se asociază specific cu proteinele virale care tapetează faţa citoplasmatică a membranei (proteina M), sau cu domeniile citoplasmatice ale glicoproteinelor virale inserate în membrană (la togavirusuri).

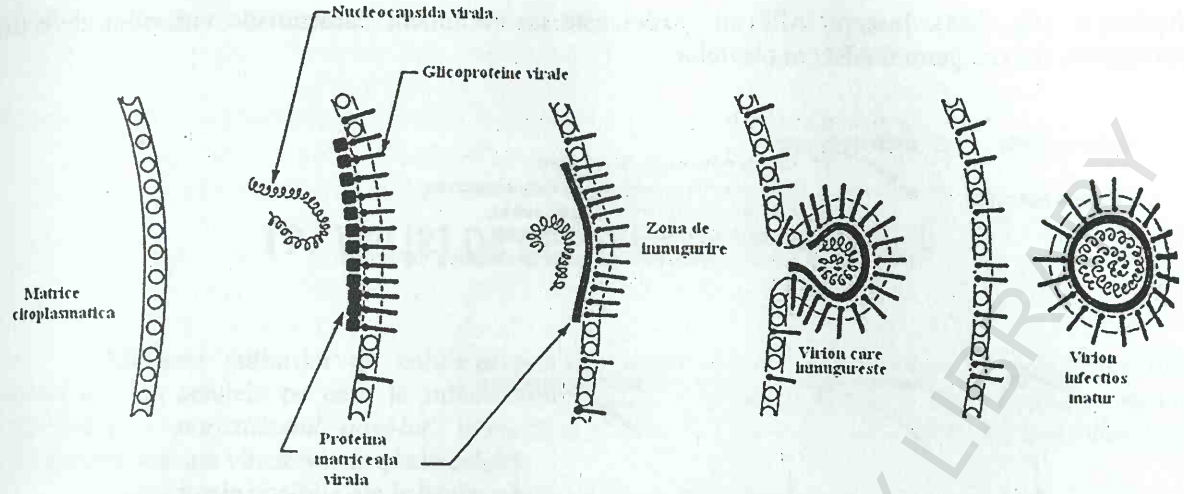


Fig. 387. Formarea învelişului viral prin înmugurire şi eliberarea virionilor progeni.

La ortho- şi paramixovirusuri, nucleocapsidele recunosc specific şi se ataşează de proteina matriceală. Ulterior începe înmugurirea şi treptat, virionul se eliberează, învelit fiind de membrana citoplasmatică, în care se găsesc inclavate glicoproteinele virale. Proteina matriceală are rolul unei punţi de legătură între nucleocapsida virală şi glicoproteinele inserate în membrană.

Lipidele şi glucidele din alcătuirea învelişului viral sunt proprii celulei. Din această cauză, compoziţia lor în structura unui virus diferă în raport cu substratul celular în care se multiplică. Datorită acestui fapt, preparatele unui virus, obţinute pe linii celulare diferite se deosebesc prin proprietăţile fizice, biologice şi antigenice.

Unele virusuri care înmuguresc, nu sunt foarte eficiente în procesul eliminării proteinelor membranare, iar fenomenul încorporării proteinelor membranare este real. De aceea, învelişul viral conţine şi glicoproteine de origine celulară şi chiar ale unui alt virus, care infectează concomitent aceiaşi celulă. Faptul este ilustrat de neutralizarea retravirusurilor, atât *in vivo* cât şi *in vitro*, de anticorpii specifici faţă de proteinele membranare. Proteinele membranare par a fi încorporate pasiv în înveliş, dacă nu împiedică steric formarea acestuia.

Eliberarea virionilor prin înmugurire este mai eficientă pentru randamentul infecţiei (producerea virusului progen), deoarece nu depinde de dezintegrarea imediată a celulei. Celula rămâne viabilă o perioadă mai lungă de timp sau după transformarea malignă este chiar nemuritoare şi eliberează virus.

Efectele virusurilor care înmuguresc, asupra celulei gazdă sunt foarte diverse: de la citoliză (toga-, paramixo, rhabdovirusuri), până la supravieţuirea nelimitată a acesteia, după transformarea cu retravirusuri.

La herpesvirusuri, virionii se învelesc la contactul cu lamela internă a membranei nucleare, traversează spaţiul dintre cele două lamele şi la nivelul porilor nucleari trec în cisternele reticulului endoplasmic şi în vezicule. Sistemele membranare închise protejează virionii de contactul cu citoplasma şi mediază transportul la suprafaţa celulei. Membrana veziculei de transport, fuzionează cu membrana citoplasmatică şi virionii sunt eliberaţi în spaţiul extracelular. Herpesvirusurile sunt totdeauna citolitice.

Celulele infectate cu virusuri care înmuguresc la nivelul membranei citoplasmatice sau la nivelul altor membrane celulare, devin ţinta antigenică pentru efectorii sistemului imunitar, care recunosc glicoproteinele codificate de virus. Cele infectate cu virusuri nude sunt recunoscute de efectorii sistemului imunitar, deoarece expun antigene virale asociate cu molecule membranare.

Particulele virale defective diferă de virionii standard, pentru că le lipseşte o parte a informaţiei genetice. Ele sunt rezultatul replicării genomului printr-un mecanism în care polimeraza se opreşte sau alunecă şi reiniţiază sinteza la un situs nou. In funcţie de direcţia reiniţierii, moleculele genomice rezultate pot fi de tipul *copierii inverse* (copy-back), de tipul *deleţiei interne* şi de tipul

duplicației (fig. 388). Inserția ARN al gazdei este un eveniment caracteristic virionilor defectivi interferenți (DI) cu genom ARN ai plantelor.

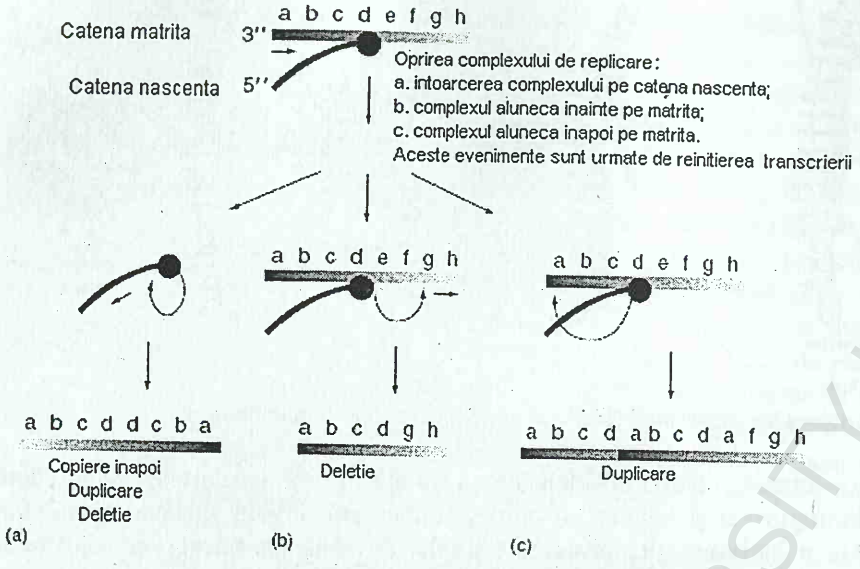


Fig. 388. Mecanismele genetice ale generării particulelor virale defective (după L. Roux, 2008).

Genomul virionilor DI are ORF întrerupte sau rearanjate şi nu codifică toate proteinele care condiționează dsfăşurarea ciclului de multiplicare. In consecință, virionii defectivi sunt dependenți de funcțiile pe care le oferă un virus omlog standard. Co-infecția celulelor cu virioni DI şi standard este esențială pentru multiplicarea DI. Generarea virionilor DI este un eveniment rar, dar este favorizat de infecția substratului celular cu un inocul la multiplicitate înaltă.

Bibliografie

Holland J. J. 1990. Defective Viral Genomes în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Pringle C. R. 1990. The Genetics of Viruses, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Pennington T. H. 1998. The Replication of Viruses, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Roizman B. 1991. *Multiplication of Viruses*, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Garoff H., Hewson R., Opstelten E.D.J. 1998. Virus Maturation by Budding. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 62, no. 4 :1171–1190.

Ramig R. F. 1990. Principles of Animal Virus Genetics, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Wiley D. C., Skehel J. J. 1991. Viral Membranes, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Roizman R. 1996. Multiplication of Viruses, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Norkin L. C. 1995. Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and the Design of Antiviral Agents. Clin. Micr. Rev., vol. 8, no. 2 : 293–315.

Dougherty W. G., Semler B. L. 1993. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes – Microbiol. Rev., 57(4): 781–822.

Maxwell K. L., Frappier L. 2007. Viral proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol.71, 2 : 398–411.

Roux L. 2008. Defective Interfering Viruses, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Leppard K. N. 2008. Adenoviruses, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Creighton T. C. 1999. Encyclopedia of Molecular Biology, 1999, John Wiley & Sons, Inc.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

19. TIPURI DE RELAŢII VIRUS-CELULĂ

Utilizarea culturilor de celule a permis definirea mai multor tipuri de interacţiuni ale virusurilor cu celulele pe care le infectează, dominate de particularitatea unică a acestor entităţi infecţioase – *parazitismul absolut*. Interacţiunea virus-celulă este modulată de particularităţile funcţionale atât ale virusului cât şi ale celulei.

Consecinţele posibile ale infecţiei virale pentru celula gazdă sunt:

- infecţia citocidă;
- infecţia necitocidă (persistentă);
- infecţia latentă, caz în care genomul persistă în celulă, dar nu se replică, nu se asamblează virus progen. Celula nu este lizată. Această formă de infecţie caracterizează adenovirusurile şi în special virusurile herpetice, care pot rămâne latente pentru perioade lungi;
- transformarea malignă.

După ce un virus infectează celula sensibilă, ansamblul rezultat constituie o unitate funcţională cu trăsături noi, distincte, care nu este suma aritmetică a celor două unităţi (celulă şi virus), ci un *complex viu,* a cărui funcţionalitate derivă din interacţiunea celor două genomuri. Uneori, genomul viral domină funcţionalitatea complexului, iar alteori informaţia genetică virală este dominată de programul genetic al celulei.

Modalităţile de evoluţie a complexului virus-celulă sunt următoarele:

- evoluţia (starea) *independentă*;
- evoluţia (starea) *dependentă* (sau interacţiunea de tip integrativ).

Starea independentă a celor două unităţi care interacţionează corespunde situaţiei în care genomul viral nu se supune mecanismelor reglatoare ale celulei. Multiplicarea virusului se realizează într-un ritm propriu, coordonat de genomul viral. Rezultatul interacţiunii este *infecţia virală productivă.*

Infecţia productivă defineşte interacţiunea în cursul căreia virusul infectant preia controlul proceselor de biosinteză celulară şi le deviază de la sinteza constituienţilor proprii, în sensul biosintezei mai mult sau mai puţin exclusivă, a constituienţilor virali. Informaţia genetică virală este exprimată integral, asigurând desfăşurarea întregului ciclu de multiplicare, asamblarea virionilor şi, în multe cazuri, moartea şi liza celulei cu eliberarea virusului progen (efect citocid).

Celulele care permit exprimarea integrală a mesajului genetic, multiplicarea şi eliberarea virusului sunt *permisive*. Permisivitatea este o proprietate datorată structurii lor genetice. Celulele permisive provin, de regulă, de la speciile pe care virusul le infectează în mod natural, deşi există numeroase excepţii (de exemplu, ortho- şi paramixovirusurile se multiplică în oul embrionat de găină). Caracterul "permisiv" şi respectiv "nepermisiv" este, cel puţin uneori, controlat genetic şi este influenţat de gradul de *diferenţiere* celulară. Celulele embrionare sunt mai permisive. Celulele *semipermisive* permit multiplicarea virală, dar cu o rată mai mică. Degenerarea celulei şi liza, dacă se produc, apar într-un interval mai îndelungat decât al celulei permisive.

Starea independentă a genomului viral faţă de celulă se poate manifesta sub două forme:

a) a sistemului independent citocid;

b) a sistemului independent echilibrat, care corespunde unei evoluţii moderate a interacţiunii.

Sistemul independent citocid corespunde relaţiei în care genomul viral se replică foarte activ. Celula este copleşită de rata înaltă a biosintezei componentelor virale şi de asamblarea virionilor

progeni. Rezultatul este dezintegrarea celulei şi eliberarea virionilor progeni. Această interacţiune corespunde *infecţiei litice productive*.

Sistemul independent echilibrat caracterizează complexele furnizate de unele virusuri moderate, care persistă în celulă, dar nu inhibă biosintezele celulare. Genomul viral se replică autonom, dar cu o rată scăzută, care asigură *persistenţa* lui în celulă şi transmiterea de la o generaţie celulară la altă. Se sintetizează macromolecule virale şi se asamblează virioni progeni. Caracteristic este faptul că genomul viral se păstrează în celulă, în stare *fizic independentă*, ca ADN episomal. Virusul determină o infecţie de lungă durată (infecţie *persistentă*) sau o *infecţie latentă*, în cursul căreia genomul viral, fizic autonom, persistă în celulă, dar nu se replică, iar celula rămâne viabilă.

Infecţiile *persistente* sunt produse de virusuri care se multiplică fără să producă modificări profunde ale metabolismului celular. Iniţial, infecţiile persistente au fost recunoscute numai *in vivo*, dar persistenţa virală se produce şi *in vitro*. In culturile celulare se recunosc două tipuri de infecţii persistente:

I) *Infecţiile echilibrate cronice* ("steady state infections", *steady*, lb. engleză = stabil) corespund situaţiei în care, toate sau aproape *toate celulele* dintr-o cultură sunt infectate cu un *virus necitocid*, care este produs continuu, uneori foarte intens. Celulele rămân viabile, metabolic active şi continuă să se dividă, iar virusul este transmis celulelor fiice. Disfuncţiile celulei, deşi iniţial sunt minore, pot duce în timp, la tulburări severe. Acest tip de infecţie a fost evidenţiat în celulele renale de maimuţă, aparent normale, contaminate cu SV_{4o} sau cu SV_5 (un paramixovirus). In culturile de celule renale, SV_{4o} se multiplică, dar celulele rămân viabile, eliberând cantităţi mari de virus în mediul extracelular.

Infecţia echilibrată, *in vitro* nu poate fi eliminată prin adăugarea anticorpilor neutralizanţi, deoarece nu există o fază de infecţie exogenă.

2) *Starea de purtător* ("carrier state") se datorează infecţiei produse de un *virus citocid*, a cărui multiplicare este limitată la *un număr restrâns de celule permisive*, dar majoritatea celulelor substratului sunt nepermisive. Persistenţa infecţiei este asigurată de transmiterea virusului progen la un număr mic de celule permisive ale culturii. Majoritatea celulelor culturii sunt nepermisive, datorită unor fenomene de rezistenţă intrinsecă sau datorită unor factori inhibitori (anticorpi, interferon) prezenţi în mediu. Spre deosebire de infecţia cronică echilibrată, starea de purtător de virus a unei culturi celulare poate fi "vindecată" (deoarece infecţia este exogenă), prin adăugarea anticorpilor antivirali neutralizanţi sau prin clonarea suspensiei celulare, la o densitate suficient de mică, pentru a permite izolarea celulelor individuale indemne.

Evoluţia dependentă sau interacţiunea de tip integrativ a fost recunoscută iniţial, pentru interacţiunea fagului λ cu celulele de *Escherichia coli* K_{12}. Genomul viral se integrează în cromosomul bacterian, ca profag (provirus) şi persistă nu numai în celula infectată, ci se transmite descendenţilor ei.

Interacţiunea de tip integrativ caracterizează raportul dintre genomul virusurilor oncogene şi celulele animale. Uneori, rezultatul interacţiunii de tip integrativ este *transformarea malignă* (efect citochinetic) a celulei, consecinţă directă a modificărilor profunde a funcţiilor celulare. Celulele transformate malign pot să producă virus progen (transformare productivă), dar în alte cazuri, producerea virusului progen nu este detectabilă. Alteori, interacţiunea de tip integrativ nu are ca efect transformarea malignă, ci constituie mecanismul molecular obligatoriu al multiplicării virale (de exemplu, pentru retravirusurile neoncogene).

În concluzie, tipurile de interacţiuni dintre un virus şi un substrat celular sunt dependente atât de originea substratului celular, de stadiul fiziologic al celulelor, dar şi de virusul infectant.

19.1. Patologia celulelor infectate cu virusuri

De cele mai multe ori, într-un substrat celular *permisiv*, multiplicarea virusurilor interferă cu funcţiile normale ale celulei gazdă şi produce modificări cu atât mai ample, cu cât gradul de sensibilitate a celulei este mai mare, mergând până la degenerare şi moarte. În celulele infectate cu virusuri, se acumulează componente virale care determină apariţia modificărilor structurale, biochimice şi funcţionale, consecinţa fiind liza celulei.

Frecvent, termenul de *efect citopatogen* este folosit în sens strict pentru a descrie exclusiv leziunile morfologice, deoarece sunt mai uşor de evidenţiat. Modificările morfologice sunt expresia celor metabolice, deşi intensitatea lor nu este totdeauna corelată direct.

Orice tip de modificare celulară indusă de virus, fie că are o expresie *morfologică,* fie numai una *biochimică* poartă denumirea de *efect citopatogen* sau *citopatic (ECP).* Noţiunea include atât efectul litic, cât şi toate celelalte modificări compatibile cu supravieţuirea.

Din punct de vedere funcţional, cele mai evidente ECP sunt de tip *citocid, citochinetic sau citotoxic.*

Infecţia de tip *citocid* induce modificări *morfologice* ce constau în schimbări ale aspectului celular: a) *constricţia* – celulele devin mai mici, se rotunjesc, iar citoplasma are aspect granular; b) *creşterea volumului celular*, creşterea refringenţei şi tendinţa de agregare; c)*vacuolizarea citoplasmei* (indusă de virusurile vacuolante tip SV_{40}), precum şi alterări nucleare sau citoplasmatice, cu diferite grade de intensitate; d)*fuziunea şi formarea sincitiilor* sunt modificări frecvente induse în special de virusurile învelite; e)apariţia *corpilor de incluzie.*

Efectul *citocid* este rezultatul infecţiei celulelor sensibile cu virusuri citolitice şi se datorează leziunilor progresive, care duc la alterarea profundă a activităţilor metabolice şi a unor structuri celulare determinând, în fazele tardive ale ciclului infecţios, moartea celulei şi eliberarea virionilor. Celulele cultivate în monostrat se desprind de suport şi manifestă alterări majore: rotunjire, vacuolizare, ratatinare (constricţie celulară), pierderea afinităţii pentru coloranţii vitali (albastru tripan, roşu neutru), ceea ce permite identificarea şi diferenţierea lor de celulele vii.

Efectul citocid şi de distrugere litică a celulelor infectate cu virus se exteriorizează macroscopic, în culturi celulare în monostrat, prin apariţia *discontinuităţilor pânzei celulare*, denumite *plaje de liză.* Ele apar ca nişte *zone clare* în mijlocul unui strat confluent de celule învecinate, de obicei ca rezultat al multiplicării în cicluri succesive, a unei singure particule virale din inoculul iniţial. Forma şi mărimea plajelor pot furniza date utile pentru identificarea virusului. Virusurile care nu lizează celula gazdă, nu produc plaje de liză.

Virusurile oncogene stimulează rata diviziunii celulelor, denumit efect *citochinetic,* de cele mai multe ori ca rezultat al transformării maligne, produsă de retravirusurile oncogene şi de dezoxiribovirusuri. Ultimele transformă numai substratul celular *nepermisiv,* cu o frecvenţă redusă.

Efectele citopatogene au, adeseori, un caracter specific şi se însoţesc de apariţia unor modificări caracteristice ce pot fi utilizate pentru a preciza natura virusului infectant.

Efectul *citotoxic* hiperacut este cauza morţii celulare, înainte de multiplicarea virală, fără producerea virusului progen. Moartea celulară este rezultatul unui *efect toxic al proteinelor virale,* consecutiv infecţiei experimentale a culturilor celulare cu un inocul masiv. Efectul toxic este produs de proteina pentonică a adenovirusurilor.

19.2. Mecanismele moleculare ale efectului citopatic

ECP este consecinţa parazitismului absolut al virusurilor, a eficienţei lor de a subordona activitatea metabolică a celulei şi de a o orienta în sensul sintezei macromoleculelor cu specificitate virală. Bazele moleculare ale ECP sunt puţin cunoscute.

Virusurile inhibă mai *multe procese celulare* pentru că un singur mecanism de acţiune nu are eficienţă completă. Mecanismele ECP sunt specifice virusului infectant.

Într-un complex virus-celulă, predomină unul dintre mecanismele prezentate mai jos.

19.2.1. Modificări metabolice

Interacţiunea citolitică produce inhibiţia sintezei macromoleculelor specifice celulei, denumită şi 'efect de întrerupere' (shutoff). In absenţa sintezelor specifice, care să înlocuiască moleculele uzate, apar modificări funcţionale şi structurale incompatibile cu viaţa.

Virusurile controlează metabolismul celular prin mai multe mecanisme, care constau în:

– schimbări în metabolismul intermediar, în special al dezoxiribonucleotidelor;

- modificări ale sintezei, prelucrării, transportului şi turnover-ului macromoleculelor celulare;
- intensificarea exprimării genelor virale şi interferenţa cu programul celular.

De regulă, virusul nu omoară celula înainte de desfăşurarea ciclului de multiplicare.

19.2.1.1. Modificări ale metabolismului acizilor nucleici celulari

Modificări ale ADN celular. Virusurile complexe (adeno, herpes) *modifică starea fizică a ADN celular*, făcând-o incompatibilă cu replicarea şi cu funcţia de transcriere, ceea ce determină inhibiţia sintezei macromoleculelor specifice celulei. Matricea nucleară este suportul fizic pentru cromatină, dar şi pentru procesele de transcriere şi replicare a ADN.

Unele *molecule virale* se asociază cu matricea nucleară şi modifică distribuţia ADN în nucleu. De exemplu, în celulele infectate cu *virusuri herpetice*, ADN se desprinde din punctele de inserţie pe matricea nucleară, iar după infecţia cu *adenovirusuri*, efectul este invers, de *marginaţie* a cromatinei (deplasarea şi aglomerarea ei spre periferia nucleului, în blocuri heterocromatice). *Virusurile pox codifică o DN-ază*, ce pătrunde în nucleul celulei şi depolimerizează ADN monocatenar, despiralizat pentru replicare sau pentru transcriere. Replicarea genomului viral (ADN sau ARN) este dependentă de rezerva de nucleotide a celulei, deoarece acizii nucleici ai celulei nu sunt degradaţi. Retravirusurile se integrează în cromosomii celulei şi stimulează rata diviziunii celulare, dar nu interferă cu replicarea ADN celular. Replicarea ADN celular are loc în faza S a ciclului şi necesită dezoxiribonucleotide, enzime de replicare şi sinteză proteică.

Dezoxiribovirusurile se multiplică în diferite tipuri de celule, chiar în cele diferenţiate terminal (de exemplu, neuroni), în care sinteza ADN şi diviziunea încetează. Ele posedă mecanisme prin care depăşesc condiţiile restrictive ale cantităţii limitate de dezoxiribonucleotid-trifosfaţi (dNTP).

Uneori, chiar celulele care se divid nu pot oferi cantităţile de dNTP impuse de sinteza ADN viral, ceea ce necesită un aport suplimentar.

Disponibilitatea limitată a dNTP este depăşită prin două mecanisme:

– virusurile cu genom mic (papova) induc *intrarea celulei în faza S.* Se exprimă genele celulare pentru sinteza enzimelor ce catalizează sinteza dNTP şi replicarea ADN. Antigenul T de 94 kDa codificat de SV_{40} se leagă de o proteină supresoare a diviziunii celulare şi a replicării ADN – proteina p53 – şi astfel se anulează efectul său inhibitor. Exprimarea unei singure gene virale pregăteşte celula pentru replicarea ADN. *Activarea genelor reglatoare ale diviziunii, stă la baza potenţialului oncogen al acestor virusuri;*

– *virusurile cu genom mare* (adeno, herpes, pox), suplimentează cantitatea de dNTP deoarece *codifică propriile enzime* ale metabolismului nucleotidelor şi ale replicării ADN. Genele virale pentru aceste enzime au fost probabil dobândite din celulă. Ele nu funcţionează dacă virusul infectează celule metabolic active, dar conferă independenţa multiplicării virale de faza S a ciclului celular. Enzimele virale catalizează aceleaşi reacţii ca şi omologele lor celulare, dar specificitatea de substrat şi mecanismele de reglare sunt diferite, ceea ce le face ţinte pentru agenţii antivirali. De exemplu, acyclovir şi gancyclovir, analogi ai guanozinei, pot fi fosforilate de Tk a herpesvirusurilor şi încorporate în catena de ADN viral, dar nu de Tk a celulei;

– adenovirusurile codifică trei proteine pentru replicarea ADN: *o ADN-polimerază, o proteină legată terminal de genom cu rol de primer al sintezei ADN viral şi o proteină care se asociază cu ADN monocatenar.* Herpesvirusurile codifică 7 proteine cu rol în replicarea ADN, ceea ce le conferă independenţa de ciclul celular şi le permite să se multiplice după *inhibiţia sintezei ADN* şi chiar în celule care nu se divid (neuroni), unde produc infecţii persistente latente.

Ca răspuns la infecţia cu unele virusuri, celulele suferă fenomenul de *apoptoză*, în cursul căreia se produce *clivajul internucleosomal al cromatinei.* In general, virusurile inhibă programul apoptotic, celula rămânând viabilă ca substrat al multiplicării virale, iar altele (influenza, Sindbis) par a fi adaptate să se multiplice în celulele apoptotice.

Modificări ale metabolismului ARN celular. Pentru sinteza proteinelor virale, este totdeauna necesară sinteza ARNm cu specificitate virală. Perturbarea metabolismului celular se produce la toate

treptele: *transcriere, prelucrare, transportul nucleo-citoplasmatic, traducere, sau modificarea ratei degradării.* Toate conferă un avantaj competitiv ARN viral prin următoarele mecanisme:

– toate *ribovirusurile* şi *poxvirusurile* codifică sinteza unei *ARN-polimeraze* cu acţiune specifică faţă de genomul viral;

– *dezoxiribovirusurile* codifică în faza timpurie, sinteza cel puţin a unui *factor viral* care schimbă specificitatea ARN-pol II celulare şi o orientează spre ADN viral, trecând-o sub controlul unui *promotor viral* foarte activ;

– *majoritatea ribovirusurilor inhibă activitatea aparatului de transcriere* al celulei, deoarece se multiplică în citoplasmă şi nu necesită activitatea de transcriere a celulei. Unele proteine virale cu rol important în ciclul de multiplicare (de exemplu *proteaza 3C* a poliovirusului şi *proteina M* a VSV), *inhibă activitatea* celor 3 ARN-polimeraze celulare, blocând *transcrierea genelor* (Lyles, 2000). Proteinele ribovirusurilor sunt localizate, în cea mai mare parte în citoplasmă, dar proteaza 3C şi proteina M se găsesc şi în nucleul celulei infectate. In cele 2 sedii proteina M îndeplineşte funcţii distincte: în *ciclul multiplicării* are rol în asamblarea virionilor şi inducerea procesului de înmugurire, iar în nucleu *inhibă transcrierea* genelor celulare. Proteaza 3C a FMDV clivează histona H_3 şi inhibă transcrierea prin alterarea matriţei cromatiniene. *Excepţia o constituie virusurile influenza* care având o fază nucleară a ciclului, necesită activitatea de transcriere a celulei pentru producerea oligonucleotidelor bonetate pe care le folosesc ca primeri pentru sinteza ARNm viral;

– cele mai multe virusuri neoncogene inhibă *maturarea ARNm* celular prin mecanisme complexe. De exemplu, proteina NS_1 a virusului gripal inhibă maturarea ARNm celular, în 2 trepte: interferă cu *treapta de clivare a ARN premesager* şi inhibă *treapta adenilării capătului 3'*. Tot ea *clivează un fragment de 10–13 nucleotide* de la capătul 5' al ARNm celular. Fragmentele au rol de *primeri* pentru iniţierea sintezei ARNm viral în nucleul celulei infectate, dată fiind incapacitatea ARN-polimerazei virale de a iniţia sinteza moleculelor de ARN. Efectul este transferul secvenţei de bonetare de la ARNm celular la mesagerii virali, făcându-i nefuncţionali pe primii şi asigurând traducerea celor virali;

– la adenovirusuri, două proteine timpurii *inhibă transferul nucleo-citoplasmatic al ARNm celular din nucleu* şi favorizează transferul ARNm viral tardiv;

– virusurile herpetice şi virusul vaccinal *măresc rata degradării ARNm* şi inhibă sinteza proteinelor celulare. Creşterea ratei degradării nu este specifică ARNm celular, deoarece mesagerii virali sunt supuşi aceluiaşi proces, dar abundenţa celor virali datorată ratei superioare a transcrierii, compensează pierderea prin degradare. In celulele infectate cu VSV, mesagerii virali, în mare exces cantitativ, sunt asociaţi cu proteina N (nucleoproteina) în complexe RNP şi formează o rezervă mare de ARNm care intră în competiţie eficientă cu ARNm al gazdei. Dar, ARNm viral este tradus preferenţial chiar când abundenţa sa este diminuată de 10 ori sau mai mult: se crede că ARNm viral conţine secvenţe ce favorizează traducerea (situsuri interne care favorizează legarea ribosomilor);

– în celulele infectate cu virusul influenza este inactivat un factor celular (eIF4E) care se leagă de secvenţa de bonetare a ARNm. Pentru a se lega de capătul bonetat, eIF4E trebuie fosforilat de o kinază celulară. In celulele infectate cu virusul influenza, eIF4E este parţial inactivat prin *nivelul redus al fosforilării*. ARNm virali au acelaşi cap bonetat şi o secvenţă de 10–13 nucleotide, ca şi mesagerii celulari şi teoretic, ar trebui să fie la fel de sensibili la inactivarea eIF4E. ARNm al virusului influenza conţine o secvenţă la capătul 5' care favorizează legarea ribosomilor şi ridică nivelul traducerii.

19.2.1.2. Modificări ale metabolismului proteinelor celulare

Sinteza, prelucrarea şi transportul proteinelor virale constituie domeniul de intersecţie a funcţiilor celulare şi virale, deoarece virusurile intră în competiţie cu mecanismele sintezei proteinelor celulare. ARNm virali şi celulari intră în competiţie directă pentru traducere. Atât celula cât şi virusul sunt dependente de aparatul celular de sinteză şi transport proteic.

Inhibiţia sintezei proteinelor celulare este una dintre consecinţele cele mai evidente ale infecţiei cu virusuri citocide, iar retravirusurile produc perturbări minime. Intre cele două extreme se situează raporturile celorlalte virusuri cu substratul în care se multiplică.

Mecanismele moleculare ale *întreruperii* sintezei proteinelor celulare şi ale schimbării specificităţii aparatului de sinteză celulară sunt multiple.

Virusurile citocide (polio, herpes, adeno, vaccinal) *întrerup selectiv sinteza proteinelor celulare* prin mai multe mecanisme:

- *inhibă traducerea mesagerilor celulari*
- *inactivează factorii* specifici ai sintezelor celulare;
- prin *transcrierea şi traducerea preferenţială a mesagerilor virali.*

Mecanismul *traducerii* discriminatorii între ARNm celular şi ARNm viral a fost dedus din faptul că inhibiţia sintezei proteinelor celulare este prea rapidă pentru a fi atribuită numai scăderii cantitative a ARNm sau inhibiţiei sintezei sale (herpes, vaccinal, rinovirus):

– ARNm al adenovirusurilor este asemănător cu ARNm celular şi este foarte eficient în competiţia traducerii cu mesagerii celulari;

– în celulele infectate cu virusul polio sau cu virusuri herpetice se produce *dezagregarea selectivă a polisomilor celulari.* Ribosomii rămân funcţionali şi disponibili pentru sinteza proteinelor virale. Pe măsură ce sinteza proteinelor virale devine detectabilă, apare o nouă clasă de polisomi, mai mari, corespunzătoare ARNm viral, care este mai mare decât dimensiunea medie a ARNm celular;

– virusul polio inactivează factori specifici ai transcrierii şi traducerii mesagerilor celulari prin intermediul proteinelor virale reglatoare, pentru că traducerea ARNm viral este independentă de secvenţa de bonetare 5'. ARNm viral are o secvenţă lungă 5' necodificatoare ce conţine un situs intern de intrare a ribosomilor.

Aproape totdeauna, în celula infectată se sintetizează o cantitate totală de proteine, mai mică decât în celula normală, deoarece, în general, infecţia diminuează capacitatea de sinteză proteică.

În multe cazuri, inhibiţia sintezei proteinelor are rolul de a inhiba *răspunsul antiviral al celulei,* iar traducerea preferenţială a ARNm viral este consecinţa adaptării virusurilor la multiplicarea în prezenţa acţiunii unor astfel de mecanisme inhibitorii.

Aproape toate ribovirusurile, în ciclul multiplicării, produc molecule de *ARN dublu catenar.* Răspunsul celulei gazdă la ARN dc este inhibiţia sintezei proteice, mediată de o *fosfo-kinază dependentă de ARN* (PKR). PKR este, în esenţă, o kinază indusă de IFN, dar cele mai multe celule exprimă constitutiv nivele semnificative ale acestei proteine. Rolul ei este de a activa răspunsul celulei la ARN dc, chiar în absenţa IFN. In prezenţa ARN dc, PKR fosforilează subunitatea α a eIF_2 şi iniţierea traducerii este astfel blocată.

Fenomenele de întrerupere au efect citopatic, pentru că inhibă metabolismul celulei.

19.2.2. Pierderea funcţiilor membranelor celulare

Virusurile alterează membrana celulei gazdă, pe două căi:

- modifică permeabilitatea membranei citoplasmatice;
- induc fuziunea membranei cu celulele învecinate.

Ambele procese sunt rezultatul *diminuării sau stopării biosintezelor* proprii celulei, precum şi al *înlocuirii* proteinelor celulare membranare, cu glicoproteine ale peplosului viral. Astfel se perturbă echilibrul mediului ionic intracelular, diminuează rata transportului nutrienţilor în celulă şi a eliminării produşilor de catabolism.

Cele mai evidente modificări ale membranei citoplasmatice sunt detectabile la celulele infectate cu virusuri învelite (herpes, mixo-, paramixovirusuri). Celulele au frecvent tendinţa de a fuziona, producând uneori *sinciţii gigante* sub forma unor mase mari de citoplasmă, delimitate de o membrană, care pot include zeci sau chiar sute de nuclei.

Procesul fuziunii celulare poate fi indus de *proteinele învelişului viral,* în special în cazul în care învelişul conţine proteine de origine celulară. Fuziunea a fost studiată în culturi de celule infectate cu virusul Sendai (un paramixovirus), care acţionează cu mare eficienţă, ca agent fuzionant. După multiplicarea virală, sinciţiile se lizează.

Procesul de fuziune celulară a fost studiat după infecţia substratului celular cu virusul inactivat prin iradiere. Virusul iradiat îşi pierde capacitatea de multiplicare, dar le păstrează pe cea hemaglutinantă

şi fuzionantă. Un virion în raporturi spaţiale strânse cu două celule, favorizează formarea unei punţi membranare ce se extinde treptat, rezultatul fiind fuziunea completă a celor două celule.

Factorul fuzionant al învelişului *paramixovirusurilor* este o proteină specifică polifuncţională (proteina F), implicată în iniţierea procesului infecţios, prin fuziunea învelişului viral cu membrana celulei sensibile, în hemoliza virală şi în fuziunea celulară. Proteina F îşi exercită efectul fuzionant, numai dacă este inclavată în dublul strat lipidic al învelişului viral şi dacă este menţinută în contact strâns cu membrana celulară, prin intermediul hemaglutininelor.

Fuziunea "din exterior" se produce numai după expunerea celulelor sensibile la doze mari de virioni infecţioşi sau inactivaţi (câteva mii de particule/celulă).

Infecţia *naturală* se face totdeauna cu un număr mic de virioni şi fuziunea este tardivă, după desfăşurarea ciclului de multiplicare. Fuziunea este mediată de glicoproteinele virale inserate în membrană. Este aşa numita "fuziune din interior", a cărei consecinţă este formarea *sinciţiilor* sau *policariocitelor*. Efectul fuzionant este foarte evident la *Paramyxovirus* şi *Pneumovirus* (virusul respirator sinciţial).

Scăderea rezistenţei membranelor lizosomale determină eliberarea enzimelor hidrolitice în citoplasmă şi prin aceasta, agravarea celorlalte mecanisme de producere a ECP.

În celula animală, modificările lizosomale evoluează în două etape: a)creşterea permeabilităţii membranelor (cu păstrarea conţinutului enzimatic); b)difuzia enzimelor lizosomale în citoplasmă şi absorbţia lor secundară în nucleul celulei infectate, asociată cu modificări morfologice (rotunjirea celulei) şi pierderea afinităţii pentru coloranţii vitali.

19.2.3. Modificări ale citoscheletului

În timpul infecţiei, majoritatea ribovirusurilor induc modificări morfologice pronunţate, al căror rezultat este rotunjirea celulei. Modificările se datorează acţiunii unor molecule virale, asupra componentelor citoscheletului sau sunt cauzate de inducerea apoptozei.

Citoscheletul este format din 3 elemente structurale: *microfilamente* alcătuite din subunităţi de *actină, microtubuli* formaţi din *subunităţi de tubulină* şi *filamentele intermediare*.

Actina este una dintre cele mai abundente şi conservate proteine ale celulei eucariote. Actina are rol structural, rol de transport intracelular, de mobilizare a organitelor şi este determinantă pentru forma celulei. Actina monomerică, globulară (actina G) se asamblează spontan *in vitro* şi *in vivo* şi formează structuri lineare sau ramificate (actina F). Filamentele polimerizează necovalent la ambele capete, dar creşterea lor este polarizată, deoarece este mai rapidă la una dintre extremităţi. Microfilamentele de actină au diametrul de 3–6 nm, sunt grupate în fascicule şi sunt foarte dinamice: se asamblează şi se dezasamblează, cu un timp de ½ de câteva minute, datorită activităţii ATP-azice a actinei.

Microtubulii sunt structuri filamentoase, cu o lungime de ordinul μm.

Filamentele intermediare s-au denumit astfel pentru că au dimensiuni intermediare între microtubuli şi microfilamentele de actină. Sunt formate din subunităţi de *citocheratină* ce formează filamente lungi care se extind sinuos între membrana citoplasmatică şi suprafaţa nucleului, dar se găsesc şi în nucleu şi sunt specifice pentru starea de diferenţiere celulară.

După infecţia virală, frecvent se produce ruperea unuia sau mai multor sisteme de fibre ale citoscheletului, în special a *microfilamentelor de actină*. Proteaza 3C a virusului polio şi proteina M a VSV care determină inhibiţia sintezei ARN celular, clivează proteina asociată microtubulilor şi celulele se *rotunjesc*. După infecţie, matricea nucleară se dezorganizează, iar efectul se manifestă în redistribuirea cromatinei.

19.2.4. Apoptoza este consecinţa inhibiţiei expresiei genelor celulare, indusă de virusuri sau se datorează răspunsului antiviral al gazdei.

În infecţia cu virusul influenza, apoptoza se datorează răspunsului antiviral al celulei: pe suprafaţa celulei este indusă expresia receptorului Fas şi a ligandului Fas. După legarea ligandului Fas, receptorul Fas induce semnalul proapoptotic.

Apoptoza este indusă de doi factori ai virusului influenza: ARN dc şi NA. Inducerea expresiei receptorului Fas este parte a răspunsului gazdei la ARN dc şi este mediată cel puţin parţial de PKR.

În celulele infectate cu VSV, unul dintre factorii inductori ai apoptozei este proteina M, inhibitoare a expresiei genelor şi a dezorganizării citoscheletului, dar răspunsul celulei la ARN dc şi în special activarea PKR au rol la fel de important.

19.2.5. Apariţia corpilor de incluzie

Corpii de incluzie sunt *structuri celulare neoformate* după infecţie, în masa cărora se acumulează componente virale. Prin localizare, incluziile reflectă *situsul* multiplicării virale.

Incluziile virale au proprietăţi tinctoriale noi (bazofile, acidofile), se detectează în localizări specifice şi sunt utile în diagnosticul virologic. După formă pot fi sferice, ovalare, piriforme sau nedefinite, în funcţie de virusul infectant. Dimensiunile lor sunt cuprinse între 1 şi 30 μm, ceea ce le face vizibile la microscopul optic. Pe imaginile electrono-optice au structură ordonată, de cristal (la adenovirusuri), sau sunt aglomerări de virioni şi macromolecule virale (la poxvirusuri).

Unice sau multiple, incluziile sunt localizate în *citoplasmă* (în celulele infectate cu poxvirusuri, ribovirusuri), *în nucleu* (în celulele infectate cu dezoxiribovirusuri) sau au localizare *mixtă* (în celulele infectate cu orthomixovirusuri). Unele incluziuni sunt mai cunoscute după numele autorilor care le-au descris: corpii Babeş-Negri (virusul rabic), corpii Guarnieri (virusul vaccinal), incluziunile Cowdry (virusul herpes). Formarea incluziilor alterează distribuţia componentelor celulare şi constituie o formă de ECP.

Semnificaţia biologică a incluziunilor virale este evidentă şi din faptul că ele se dezvoltă pe măsura progresiei ciclului de multiplicare. Incluziunile sunt markeri structurali ai procesului dinamic prin care celula produce virus. Ele reprezintă, în general, "fabricile de virus" în care are loc sinteza componentelor virale (acizi nucleici, proteine) şi are loc morfogeneza virionilor.

Prin specificitatea şi localizarea lor, incluziunile indică sediile celulare ale multiplicării virale. Ele sunt un indicator util pentru demonstrarea naturii virale a unor leziuni celulare, iar morfologia şi dispoziţia lor caracteristică în anumite celule, constituie un important criteriu de diagnostic în unele viroze. Astfel, punerea în evidenţă a incluziilor rabice (corpusculii Babeş-Negri) în neuronii din cornul lui Ammon, permite precizarea diagnosticului de turbare la omul şi animalele suspectate de a fi murit după infecţia cu acest virus.

Bibliografie

Andrew Ball L. 1998. Virus- Host Cell Interactions, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Subak-Sharpe J. H., Pringle C. R. 1990. Viral information controlling DNA and RNA Animal Virus Replication, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Knipe D. M. 1991. Virus-Host-Cell Interactions, în vol. Fundamental Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Carrasco L. 1995. Modification of Membrane Permeability by Animal Viruses – Advances in Virus Research, vol. 45: 61–110.

Knipe D. M. 1996. Virus-Cell Interactions, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Bablanian R. 1972. Mechanisms of Virus Cytopathic Effects – Symposia of the Society for General Microbiology, no. XXII. Microbial Pathogenicity in Man and Animals.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

20. RELAŢIILE DINTRE VIRUSURI ŞI ORGANISME

Virusurile sunt totdeauna *potenţial patogene* pentru organismul gazdă, deoarece alterează profund activitatea fiziologică a celulei.

Patogeneza studiază mecanismele prin care un agent infecţios alterează starea fiziologică a gazdei şi se exprimă cantitativ prin *virulenţa* virală.

Virulenţa este o proprietate multifactorială, care exprimă cantitativ capacitatea unui virus de a se multiplica, de a se disemina în organism în competiţie cu efectorii răspunsului imun şi de a produce stări patologice de diferite intensităţi. O tulpină virală este mai virulentă decât alta dacă produce o infecţie mai severă la alţi indivizi ai aceleiaşi linii genetice. *In vitro* virulenţa se evaluează prin intensitatea ECP, dar *in vivo* se evaluează după alţi parametri. Virusurile citocide *in vitro* nu sunt în mod obligatoriu virulente *in vivo* şi invers.

Virulenţa se exprimă totdeauna în raport cu un organism dat. Virusurile care au efect citolitic (citocid) au virulenţă extremă, în timp ce virusurile ale căror interacţiuni cu celula gazdă se manifestă prin efect citochinetic (transformant), au o virulenţă moderată (sunt virusuri temperate).

Pentru a produce manifestări clinice, virusul trebuie să infecteze celulele sensibile, să se multiplice şi să producă leziunile celulare. Înţelegerea mecanismelor moleculare ale patogenezei este o condiţie pentru alegerea strategiilor antivirale specifice. Virulenţa este dependentă de câteva particularităţi ale gazdei:

– de *numărul celulelor sensibile* şi de posibilitatea de acces a virusului la substratul celular permisiv. Liza unui număr mic de celule specializate funcţional poate periclita viaţa, dar distrugerea unui număr mare de celule mai puţin specializate (celulele epiteliale) produce efecte mai puţin grave;

– de *intensitatea şi complexitatea reacţiilor de apărare* a gazdei, care determină eliminarea şi inactivarea virusului şi/sau a celulelor infectate.

20.1. Căile de intrare a virusurilor

Tegumentul intact este barieră impermeabilă pentru agenţii infecţioşi. Puţine virusuri depăşesc această barieră şi iniţiază infecţia prin *microleziuni* (pox, papiloma, herpes). Epiderma nu este vascularizată şi infecţia poate să rămână localizată (papiloma, moluscum contagiosum). Virusurile inoculate profund prin derm, în ţesutul subcutanat şi în muşchi prin injectare, prin acupunctură, prin perforare (piercing), tatuaj sau prin muşcătură (VHB, virusul rabic) se diseminează la distanţă.

Leziunile datorate erupţiilor tegumentare se numesc *macule, papule, vezicule sau pustule*. Maculele se datorează dilatării vaselor sanguine dermice. Dacă se produce edemul şi infiltrarea leucocitară, macula progresează la *papulă*. Dacă leziunea implică epiderma se numeşte *veziculă* şi evoluează la stadiul de *pustulă* dacă lichidul veziculei este infiltrat cu leucocite (PMN). *Erupţia hemoragică* şi cea *peteşială* se produc după implicarea severă a vaselor sanguine dermice. Unele virusuri (pox, herpes) se diseminează prin leziunile tegumentare, deoarece se găsesc la titru înalt în lichidul veziculo-pustular şi virusul trece prin contact direct la o altă gazdă.

Conjunctiva este locul de intrare a unor virusuri care produc conjunctivita sau se diseminează (de exemplu, infecţia paralitică cu enterovirus). Inocularea directă a adeno- în conjunctivă produce keratoconjunctivita. Conjunctivita 'de piscină' este produsă de adeno- 3 şi 7, dar şi de echo- sau coxsackievirusuri. Rareori, virusul se disemineză din conjunctivă în SNC, unde produce poliomielită, radiculomielopatie sau pareze ale nervilor cranieni.

Mucoasa *tractului respirator* este protejată de agenţii infecţioşi prin secreţia mucoasă, deplasată sub acţiunea mecanică a cililor celulelor epiteliale, de IgA şi de celulele limfoide din tonsile şi adenoide. In alveole se găsesc macrofage. Temperatura de 33° în partea superioară a tractului este protectoare faţă de infecţia cu multe virusuri, dar este optimă pentru infecţia cu rinovirusuri.

Virusurile pătrund în tractul respirator, odată cu aerosolii generaţi prin tuse sau strănut sau cu saliva. Aerosolii cu diametrul mai mic de 5 μm ajung în spaţiul alveolar. Virusurile învelite sunt mai stabile la condiţiile mediului extern (uscăciune) comparativ cu cele nude, ceea ce explică frecvenţa mai mare a infecţiilor produse de influenza, parainfluenza, VRS, faţă de cele cu virusuri nude (adeno, rhino).

Tractul gastro-intesti nal este locul de intrare a unor virusuri care produc infecţii locale, limitate la celulele epiteliale adiacente lumenului (rota-, corona-, adeno-) sau invadează şi produc infecţii sistemice (entero-, VHA). Infecţiile sistemice semnifică traversarea mucoasei şi invadarea ţesuturilor subiacente. Mediul acid al stomacului, proteazele secretate de celulele gastrice şi pancreatice şi secreţia biliară ce se varsă în duoden creează un mediu restrictiv pentru infecţiozitatea unor virusuri. Mucusul este secretat de celulele gastrice şi intestinale şi conţine IgA. Picornavirusurile sunt rezistente la mediul acid, cu excepţia rinovirusurilor. La multe virusuri, modificările proteolitice stimulează infecţiozitatea virală. Enzimele proteolitice induc dezagregarea parţială a capsidei virusurilor nude (picorna-, reo-) şi învelite, stimulând infecţiozitatea lor: capsida externă a reovirusurilor este dezagregată parţial, odată cu activarea ARN-polimerazei. Invers, virusurile care suferă modificări ample sub acţiunea enzimelor proteolitice sunt inactivate.

Invelişul viral este sensibil, fiind disociat sub acţiunea detergentă a sărurilor biliare, iar capsida este rezistentă. Aşa se explică faptul că virusurile învelite (cu excepţia corona-) nu pătrund pe calea gastro-intesti nală.

Rotavirusurile produc infecţii limitate exclusiv la epiteliul mucoasei intestinale, iar reovirusurile aderă de celulele M şi ajung în plăcile Peyer.

Tractul *urogenital* poate fi locul pătrunderii unor virusuri, prin leziunile epiteliului vaginal sau prin traumele uretrei: HIV, HSV, HPV 11, 16, 18 (produc negi genitali = condiloma acuminata), iar adeno- 11 şi 21 produc cistita hemoragică acută la băieţi. Poliomavirusurile produc virurie, fără simptome clinice. Unele virusuri ajung în rinichi, probabil pe cale sanguină şi apoi intră în urină.

Infecţia placentară. Cele mai multe infecţii virale materne nu implică fătul, dar unele virusuri traversează placenta, infectează fătul şi influenţează dezvoltarea pe cale directă, ca rezultat al infecţiei ţesuturilor. Reacţia febrilă a organismului matern poate să influenţeze indirect dezvoltarea fătului. Efectele infecţiei fetale sunt corelate direct cu stadiul dezvoltării. Infecţiile congenitale sunt produse de HSV, VZV, VHB, de virusul rujeolei, oreionului, HIV, parvo-, rubeolei şi de unele enterovirusuri.

Căile de transmitere a virusurilor nu sunt reciproc exclusive: un virus se transmite pe mai multe căi.

În general, virusurile se multiplică la poarta de intrare (în mucoasa tractului respirator, gastro-intesti nal) şi nu se disemineză în alte ţesuturi. Situsul la nivelul căruia virusul se multiplică după ce a pătruns în organism se numeşte *focar de infecţie primară.* In raport cu tropismul pentru diferite celule, unele virusuri se multiplică şi produc leziuni la nivelul porţii de intrare.

Din focarul primar, infecţia se disemineză în două modalităţi:

– *trecerea directă* a virionilor din celula infectată în celulele adiacente, în special pentru virusurile care înmuguresc şi induc fuziunea celulelor. Infecţiile progresează foarte rapid;

– *eliberarea virionilor în spaţiul extracelular* şi reluarea ciclului de adsorbţie şi fixare pe celulele adiacente. In spaţiul extracelular, virionii sunt expuşi mecanismelor de apărare a organismului.

Alte virusuri produc manifestări patologice la distanţă de locul intrării. De la locul pătrunderii şi eventual al multiplicării primare, trebuie să fie *diseminate*, pentru a ajunge la celulele sensibile, permisive pentru multiplicare. De exemplu, enterovirusurile pot să producă infecţia SNC.

După multiplicarea la poarta de intrare, virusurile se disemineză pe cale sanguină, limfatică sau secreţii, producând starea de *viremie*. Virionii pot fi liberi în plasma sanguină sau se asociază cu diferite tipuri de leucocite, cu sau fără multiplicare. Faza viremică este scurtă.

Patogenitatea virală s-a studiat pe modelul experimental al animalelor de laborator, dar rezultatele nu sunt întru-totul extrapolabile şi analoge infecţiilor în condiţii naturale, la om şi animale.

20.2. Tropismul viral

Particularităţile de patogenitate a virusurilor, în special ale celor infecţioase pentru organismul uman şi animal sunt determinate de *tropismul* lor.

Tropismul sau afinitatea semnifică proprietatea unui virus de a infecta anumite specii de organisme (*genotropism**), anumite ţesuturi (*histotropism*) sau anumite celule ale unui ţesut (*citotropism*).

* În condiţii naturale, spectrul de gazdă al unor virusuri este foarte restrâns: virusurile gripale produc efecte patologice numai la om, virusul polio şi rinovirusurile infectează numai omul, iar aftovirusul infectează paricopitatele. In condiţii experimentale, unele virusuri (vaccinal, rabic) pot infecta un număr mai mare de specii animale, cu condiţia utilizării unei doze de inocul suficient de mare.

Manifestările patologice ale infecţiilor virale sunt variabile şi dependente de *histotropism* şi *citotropism*. În raport cu aceste proprietăţi, virusurile pot fi clasificate în următoarele categorii:

– virusuri *dermotrope*, cu afinitate pentru tegument şi mucoase (poxvirusuri);

– virusuri *neurotrope*, cu tropism pentru SNC (virusul rabic, virusurile encefalitogene, virusul polio);

– virusuri *dermo-neurotrope*, cu afinitate pentru celulele tegumentare şi pentru SNC (virusurile herpetice);

– virusuri *organotrope* (viscerotrope), cu afinitate pentru organele interne (virusurile hepatitice);

– virusuri *pantrope*, cu afinitate pentru celulele sistemului reticuloendotelial (fagocite, celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splină şi ganglioni, celulele endoteliale ale vaselor sanguine şi limfatice, fibroblastele ţesutului conjunctiv).

În general, virusurile au afinitate, îndeosebi pentru celulele normale sau patologice care se divid cu o rată mai înaltă, dar şi pentru unele celule care nu se divid, înalt specializate ca structură şi funcţie. De exemplu, virusul polio infectează motoneuronii din măduvă, dar în cazurile grave, chiar neuronii din coloanele posterioare, din ganglionii spinali senzitivi, din substanţa reticulată, din nucleii cerebeloşi, din cortexul motor din girul precentral.

Mecanismele tropismului celular par a fi condiţionate de doi factori:

– de existenţa *moleculelor* membranare cu rol de receptor, care-condiţionează interacţiunea virusului cu suprafaţa celulei. Ipoteza a fost dedusă din modificarea sensibilităţii unor celule după cultivare. De exemplu, rinichiul uman şi amniosul, *in situ* nu sunt infectate de *Poliovirus*, dar devin foarte sensibile după cultivare. Sensibilitatea este corelată cu expunerea pe suprafaţa celulelor, *in vitro*, a situsurilor de legare a virusului. Receptorii sunt molecule cu rol în metabolismul celular, dar au afinitate şi pentru virus;

– de *starea de permisivitate* a celulei. Virusurile se multiplică în celulele care nu pot să declanşeze un răspuns antiviral mediat de IFN α/β. Multe virusuri pot interacţiona cu mai mulţi receptori ai celulei, prin intermediul unuia sau mai multor liganzi.

20.2.1. Neurotropismul

Virusul rabic este singurul care manifestă un neurotropism bine exprimat. Celelalte virusuri care infectează SNC nu sunt neurotrope în sensul strict al afinităţii lor pentru sistemul nervos. Gradul de afinitate pentru SNC şi gravitatea infecţiilor pe care le produc sunt exprimate în termeni diferiţi:

- neurotropismul – afinitatea unui virus pentru celulele SNC (neuroni şi celule gliale);
- neuroinvaziv – capacitatea de a pătrunde în SNC;
- neurovirulenţă – capacitatea de a produce infecţii ale SNC cu consecinţe clinice.

Neuroinvazivitatea şi neurovirulenţa nu sunt proprietăţi totdeauna corelative: de exemplu, virusul oreionului este foarte neuroinvaziv, dar neurovirulenţa este limitată şi produce meningită, însă chiar în cursul infecţiei parotidiene obişnuite se produc modificări ale compoziţiei LCR la peste 50% dintre pacienţi, ceea ce sugerează posibila implicare a sistemului nervos; HSV are neuroinvazivitate scăzută, infectează rareori SNC, dar neurovirulenţa este înaltă şi consecinţele clinice pot fi foarte grave.

Ţesutul nervos are particularităţi structurale şi funcţionale, care oferă condiţii unice pentru multiplicarea virusurilor, datorate în primul rând barierei sânge-creier.

Conceptul de 'barieră' a fost formulat odată cu observația că albastru tripan (trypan blue), un colorant vital, după ce este injectat în circulația sistemică, colorează toate țesuturile cu excepția creierului și măduvei spinării. Bariera capilarelor cerebrale rezidă în joncțiunile strânse dintre celulele endoteliului capilar, o membrană bazală densă și în numărul mare al rețelei de prelungiri ale astrocitelor. Coloranții vitali nu străpung bariera și nu colorează SNC.

În plexurile coroide, bariera sânge-creier are o structură diferită: capilarele plexului coroid sunt fenestrate, iar membrana bazală lipsește. Coloranții și particulele trec în plexul coroid, dar nu pătrund în LCR, datorită joncțiunilor strânse localizate în zona apicală a celulelor epiteliului secretor al plexului coroid. Între măduva spinării și canalul ependimar schimbul este liber.

Bariera sânge-creier exclude virusurile, limitează accesul celulelor imunocompetente și anticorpilor. SNC nu are sistem limfatic intrinsec și are puține celule fagocitare. Barierele fizice care se opun invaziei virale, împiedică accesul celulelor care epurează virusul. Din acest motiv, infecțiile persistente sunt mai comune în SNC.

Spațiile interneuronale sunt de 10-15 nm, mult mai mici decât cele mai mici virusuri, fapt care restricționează diseminarea virusurilor și a celulelor inflamatorii.

Virusurile neurotrope sunt transportate de la locul inoculării, în SNC, prin filetele nervoase și prin sânge, iar în interiorul SNC prin fibrele interneuronale. Virusurile rabic, HSV și polio sunt transportate în nevrax prin filetele nervilor. Virionul este înglobat în vezicule la capătul terminației nervoase și este transportat anterograd (în sensul polarității fiziologice a neuronului) sau retrograd (în sens opus polarității fiziologice) spre corpul neuronilor motori sau senzitivi. Calea neuronală de intrare în nevrax este importantă în infecția primară cu virus rabic și polio.

Diseminarea olfactivă a virusului este o variantă a diseminării neuronale. Axonii neuronilor senzitivi ai mucoasei olfactive conectează mediul extern cu emisferele cerebrale: aerosolii contaminați cu virus rabic produc infecții accidentale la om și infecții ale liliecilor în peșteri. Calea olfactivă ar fi adecvată pentru diseminarea HSV, ceea ce ar explica localizarea frontală și temporală a encefalitelor.

De cele mai multe ori, virusurile invadează SNC pe *cale sanguină*. Condiția preliminară este multiplicarea tisulară urmată de o viremie cu o densitate suficientă a virionilor pentru a depăși bariera hemato-encefalică. Unele virusuri se multiplică în celulele endoteliale ale vaselor sanguine și limfatice, iar altele, în mușchii striați. Din mediul intern (sânge, limfă), virusurile sunt eliminate cu o rată dependentă de dimensiuni: virionii de dimensiuni mici (toga-, flavivirusuri) se multiplică rapid în țesuturile periferice și realizează titru viremic înalt. Alte virusuri se adsorb pe eritrocite, iar virusurile rujeolic și herpetic infectează leucocitele și scapă de epurarea de către celulele Kupffer și celulele sistemului reticulo-endotelial*.

* Conceptul de *sistem reticulo-endotelial* (SRE) a fost creat de Aschoff (1924) în care a inclus:
- fagocitele propriu-zise;
- celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splină și ganglioni;
- celulele endoteliale ale vaselor sanguine și limfatice ;
- fibroblastele din țesutul conjunctiv.

Virusurile care se multiplică în celulele endoteliale ale capilarelor trec direct în SNC, sau prin plexul coroid. Virusurile neuroinvazive pot depăși bariera endotelială prin numărul mic de vezicule de endopinocitoză. Intrarea pe calea leucocitelor infectate este teoretic posibilă, dar traficul leucocitar în SNC este limitat. Traumatismele și procesele inflamatorii datorate altor cauze creează condiții favorabile traficului leucocitar și infecției cu virusuri transportate de leucocite. Virusul oreionului infectează epiteliul plexului coroid și trece în SNC.

Unele virusuri infectează atât neuronii cât și celulele gliale (HSV), iar altele infectează selectiv anumite tipuri de celule din SNC. Astfel, virusul oreionului infectează numai meningele și plexul coroid și produce meningite benigne, deși infecția celulelor ependimare poate produce stenoza apeductului Sylvius (conductul care leagă ventriculii III și IV) și hidrocefalia.

Infecția cu virusul polioma JC este limitată la oligodendrocite, manifestarea clinică secundară fiind *leucoencefalopatia multiplă progresivă* (LMP).

ECP și manifestări clinice. Celulele țesutului nervos infectate cu virusuri pot evolua astfel:

– celulele SNC pot fi lizate și rezultă distrugerea regională a creierului sau liza populațiilor celulare specifice;

– infecția necitopatică a celulelor SNC, fără modificări histologice evidente duce la infecția persistentă, fără manifestări clinice (de exemplu, infecția cu LCMV la șoarecele nou născut);

– celulele infectate nu sunt lizate de multiplicarea virusului, dar sunt distruse de efectorii imunitari (LCMV la șoarecele adult).

HIV nu pare să infecteze neuronii sau celulele gliale pe cale directă, dar infecția SNC este comună. Majoritatea celor infectați cu HIV au și infecție a SNC, pentru că virusul are neuroinvazivitate înaltă. HIV infectează macrofagele și microglia, derivată din macrofage. Celulele infectate pot fuziona cu neuronii, dar maladia neurologică în perioada latenței clinice este rară. In această perioadă HIV nu este neuroinvaziv. După instalarea imunodeficienței, HIV are neurovirulență înaltă: cel puțin 50% dintre pacienți fac demență* progresivă, datorată probabil proteinelor virale sau limfokinelor a căror sinteză este stimulată de antigenele virale, pentru că în SNC virusul este localizat în microglie și în macrofage. Proteinele virale și citokinele eliberate de celulele infectate sunt toxice pentru țesutul nervos sau interferă cu funcțiile neuronale, ceea ce explică encefalita cu alterarea stării mentale la unii pacienți SIDA.

* Demența este o boală cronică cu deteriorarea progresivă a funcției cognitive, produsă nu numai de prioni, ci și de HIV sau de virusul rujeolic.

Cele mai frecvente cauze ale encefalitei sunt HSV și arbovirusurile. HSV infectează neuronii și celulele gliale. La nou-născut produce encefalita necrozantă difuză, iar la adult, encefalita focală. Arbovirusurile infectează neuronii. Flavivirusurile infectează corpii striați și nucleii trunchiului cerebral, cauzând mișcări dezordonate și insuficiență respiratorie.

Infecțiile virale care implică atât creierul cât și măduva spinării sunt desemnate cu termenul de *encefalomielite*. Același termen se folosește pentru encefalita post-infecțioasă, posibil de origine autoimună. Encefalomielita post-infecțioasă apare la 3–14 zile după exantemul rujeolic și se caracterizează prin demielinizare autoimună ce pare să evolueze în absența infecției neuronului.

Sindromul PESS (panencefalita sclerozantă subacută) este o boală demențială produsă de virusul rujeolic, care infectează neuronii și celulele gliale. Infecția țesutului nervos este lentă, progresivă și difuză. Sindromul are o frecvență mică: 1/milion dintre copiii aparent sănătoși fac acest sindrom la 7–8 ani după o infecție rujeolică necomplicată. Demența evoluează lent, asociată cu mișcări mioclonice și cu titrul înalt al Ac specifici anti-virus rujeolic, în ser și în LCR. Moartea survine după circa un an, dar maladia poate avea o evoluție lentă, de până la 6 ani.

Infecțiile rabică și poliomielitică produc sindroame caracteristice datorită infecției selective a unor populații specifice de neuroni. Poliovirusul infectează neuronii motori și produce paralizia flască, iar virusul rabic infectează în primul rând neuronii sistemului limbic, alterând comportamentul: animalul devine agresiv, pe fondul unei agitații motorii accentuate, ceea ce favorizează transmiterea virusului.

20.2.2. Enterotropismul

Virusurile enterotrope sunt asociate cu maladia diareică acută. Gastroenterita la om poate fi cauzată de virusuri, bacterii, protozoare. Patogeneza diferă în funcție de agentul infecțios. Simptomele clinice sunt asemănătoare: de la cele ale regiunii superioare (vomă), până la diaree acută apoasă sau sanguinolentă, fără vomă sau simptome asociate.

Gastroenterita virală este o problemă globală de sănătate la copii. Virusurile care produc gastroenterita aparțin unor familii diferite: *rotavirusuri* (incidență 30–60%), *norovirusuri* (denumite anterior Norwalk-like virusuri sau small round structured viruses) și *saporovirusuri* (*calicivirusuri* clasice – 8–30%); *astrovirusuri* (6–9%), *adenovirusuri* enterice (grupul F – 3–6%).

Virusul Norwalk (familia *Caliciviridae*) este un agent semnificativ al gastroenteritei la om.

Familia *Caliciviridae* cuprinde 4 genuri: *Norovirus* (virusul Norwalk), *Sapovirus, Lagovirus* (virusul bolii hemoragice la iepure) și *Vesivirus* (virusul exantemului vezicular la porc, virusul felin și virusurile marine – infecțioase pentru pinipede, balene, pești).

Primele 2 genuri cuprind virusuri umane ce nu pot fi cultivate, iar ultimele 2 includ virusuri infecțioase necultivabile.

Virusul *Norwalk* produce epidemii de gastroenterită la adult, cu transmitere rapidă la persoanele de orice vârstă, iar *Lagovirus* a fost introdus în Australia, în 1995, pentru controlul populației de iepuri.

Caliciviridele se transmit prin ciclul fecal-oral. Doza infecțioasă este mică și de aceea transmiterea este foarte eficientă.

Astrovirusurile au morfologie de stea, pe preparatele colorate negativ, la microscopul electronic (ME), cu diametrul de 28–30 nm. Genomul este o moleculă de ARN mc de polaritate pozitivă. Infectează enterocitele, se elimină în conținutul intestinal la titru înalt și produc diaree la copii, în comunitățile de vârstnici și la imunodeficienți. Se transmit prin ciclul fecal-oral, prin alimentele contaminate sau prin contactul direct al persoanei contaminate cu persoane sănătoase.

Alte virusuri infecțioase ale tractului digestiv, neasociate în mod constant cu diaree :

- enterovirusuri, reovirusuri, coronavirusuri și parvovirusuri;
- HIV poate infecta direct intestinul (enterocitele ?);
- în condiții de imunosupresie, alte virusuri infectează tractul digestiv: herpes simplex, CMV.

Multe dintre virusurile gastroenterice umane nu se cultivă de loc sau se multiplică slab în culturi celulare și de aceea *izolarea* nu este o metodă de diagnostic, dar examenul ME permite diferențierea pe baza morfologiei caracteristice. Metoda examenului morfologic are o sensibilitate mică (sunt necesare 10^6 particule virale/ml). Rota- și astrovirusurile se detectează ușor pentru că sunt eliminate în număr foarte mare (10^{11} particule/ml conținut fecal). Calicivirusurile se eliberează la densități mici și numai în faza timpurie a fazei clinice.

Metoda RT-PCR este mult mai sensibilă (20-100 molecule ARN/ml sunt detectabile). RT-PCR și tehnicile serologice cu Ag recombinante au fost esențiale pentru evaluarea frecvenței infecțiilor umane cu astro- și calicivirusuri.

Cele mai multe infecții gastroenterice au 2 tablouri epidemiologice distincte:

– la copii, diareea este *endemică*, fiind produsă de rota- grup A, calici-, astro- și adenovirusuri grupul F. Până la vârsta de 5 ani, mulți copii au fost deja infectați, adeseori asimptomatic, cu toate aceste virusuri. Transmiterea este fecal-orală, dar probabil și prin aerosoli sau prin contact fizic strâns;

– *epidemiile* (produse de calicivirusuri, uneori de astro- și rotavirusuri de grup B și C) se manifestă la toate vârstele, iar agentul patogen este transmis prin alimentele contaminate (moluște) sau prin apă.

Tratamentul constă în rehidratare orală sau intravenoasă cu fluide ce conțin electroliți și zahăr.

Prelucrarea alimentelor, purificarea apei potabile și a apei din bazinele de înot, educația sanitară a lucrătorilor din industria alimentară, sunt măsuri importante pentru reducerea numărului focarelor de potențiale epidemii.

20.3. Tipuri de infecții *in vivo*

Interrelațiile dintre virusuri și organisme sunt modulate de virulența virală, de sistemele de apărare, de tipul celulelor infectate. Astfel modulată, multiplicarea virusurilor în organism produce mai multe tipuri de infecții: *infecția inaparentă, infecția acută, infecția persistentă*, cu diferitele sale modalități de evoluție:

- infecția cronică
- infecția latentă
- infecția lentă.

Infecțiile inaparente definesc situațiile în care virusul se multiplică într-o măsură limitată în celulele pentru care manifestă un tropism natural, dar nu determină simptome clinice. Marea majoritate a infecțiilor sunt inaparente sau produc simptome ușoare, astfel că trec aproape neobservate. Chiar cele mai virulente virusuri, produc mai multe infecții inaparente decât infecții clinice. De exemplu, virusul polio manifestă un tropism evident pentru celulele mucoasei digestive, dar infecția evoluează inaparent. Leziunile poliomielitice, cu manifestări patologice apar la un număr redus de persoane, la care virusul infectează motoneuronii medulari.

Infecţiile inaparente au o importanţă deosebită în *epidemiologie*[*]. Ele reprezintă rezervoare necunoscute de virus, foarte greu de depistat. Evoluţia unei infecţii în forma sa inaparentă este condiţionată, în principal, de sistemele specifice (răspunsul imun celular şi humoral) şi nespecifice de apărare (interferonii).

[*] Epidemiologia este un domeniu al ştiinţelor medicale care studiază căile de eliminare, de transmitere şi de pătrundere a agenţilor patogeni în organism.

Infecţiile acute sunt consecinţe rare ale infecţiei virale. Sunt determinate de virusurile care depăşesc sistemele de apărare a organismului şi produc leziuni mai mult sau mai puţin ample, cu alterarea stării generale a organismului.

Pentru infecţiile acute, perioada de incubare este urmată de perioada "de stare", cu manifestările clinice. La nivel celular, infecţiile acute sunt de tip *productiv*. Este produs virus progen şi de cele mai multe ori se produce liza celulară.

Infecţiile acute au o durată limitată în timp. Rezultatul final al infecţiei depinde de virulenţa agentului infecţios şi de intensitatea reacţiilor de apărare a gazdei. De cele mai multe ori, virusul este eliminat din organism, lăsând după caz, o stare de imunitate mai mult sau mai puţin solidă.

Infecţiile virale sunt, de obicei, autolimitate, dar uneori evoluează perioade lungi şi se numesc *infecţii persistente*.

20.3.1. Persistenţa virală

Infecţiile persistente definesc o relaţie de lungă durată a agentului infecţios, cu substratul celular sau cu organismul gazdă, uneori pentru tot restul vieţii. Evoluţia persistentă poate să se exprime de la început, adică din momentul infecţiei, sau este consecutivă unei infecţii acute. Infecţiile *persistente* constituie un fenomen biologic semnificativ pentru interacţiunea unor virusuri cu gazdele lor.

Persistenţa este consecinţa faptului că dispariţia simptomelor unei infecţii acute nu este însoţită de eliminarea virusului. Virusul se păstrează în organism, în situsuri celulare sau anatomice unde este protejat în competiţia cu efectorii răspunsului imun (tabelul 68). Persistenţa determină *recurenţa* (revenirea) formei acute a infecţiei şi bolii sau a formei atenuate a acesteia.

Bazele moleculare ale evoluţiei persistente a infecţiei au fost studiate *in vitro*, în sisteme celulare. Rezultatele nu pot fi întru-totul extrapolate pentru a explica persistenţa celulară *in vivo*, deoarece infecţia naturală este produsă de o tulpină sălbatică de virus, care poate interacţiona cu o multitudine de tipuri celulare specializate, dar mai ales pentru faptul că *in vivo*, virusul se multiplică sub presiunea selectivă permanentă a factorilor de apărare a gazdei.

Infecţiile persistente au fost împărţite în trei categorii:

– *infecţii persistente*, în cursul cărora virusul este produs permanent. Au fost denumite infecţii *cronice* sau *productive*: infecţiile produse de virusul hepatitei B şi C umane, de HIV şi de virusul coriomeningitei limfocitare (LCM) la şoarece;

– *infecţia latentă* se caracterizează prin perioada îndelungată a evoluţiei, în cursul căreia virusul nu este produs permanent, ci numai la intervale de timp (infecţiile herpetice);

– *infecţii lente* formează un grup cu caracteristici definitorii: perioada de incubare foarte lungă (luni, ani), evoluţia progresivă şi lentă a procesului patologic, totdeauna fatală. La om şi animale, infecţiile lente pot determina şi declanşa boli neurodegenerative cronice: virusul polioma JC produce leucoencefalopatia progresivă multifocală, iar virusul rujeolei produce PESS (panencefalita sclerozantă subacută), probabil o maladie autoimună în cursul căreia neuronii nu sunt lizaţi. O altă infecţie lentă tipică este produsă de virusul Visna (un retravirus), agentul panencefalitei bovinelor. Infecţiile lente sunt însoţite de modificări neuronale, dar reacţia inflamatorie nu este stimulată.

Această clasificare este încălcată de numeroase excepţii, deoarece pentru unele virusuri, persistenţa implică succesiunea etapelor de infecţie productivă şi latentă. De exemplu, virusul hepatitei B (VHB) infectează cronic (productiv) hepatocitele, dar limfocitele sunt infectate latent, iar virusul Epstein-Barr (EBV) infectează productiv celulele epiteliului faringian, dar infectează latent limfocitele B.

Pentru ca un virus să producă o infecție persistentă, trebuie să îndeplinească trei condiții:
- să nu lizeze celula infectată (efectul citopatic să fie minim);
- genomul viral să poată fi menținut pe termen lung în celula gazdă;
- sa evite detectarea și eliminarea de către efectorii sistemului imunitar.

Infecții persistente în organismul uman produse de virusuri (după R. Ahmed, 1996): *Tabelul 68.*

	Locul persistenței	*Consecințe*
Adenovirusuri	Adenoide, tonsile, limfocite	Necunoscute
CMV	Rinichi, glande salivare, limfocite?, macrofage?, celule stromale ale maduvei osoase	Pneumonie, retinită
EBV	Celule epiteliale faringiene, limfocite B	Mononucleoza infecțioasă, limfomul Burkitt, carcinom nazofaringian, limfom non-Hodgkin
HSV I și 2	Neuronii ganglionilor senzitivi	Leziuni herpetice orale, genitale, encefalita, keratita
Virusul herpetic uman 6	Limfocite	Exantem
VZV	Neuronii ganglionilor senzitivi și celulele satelite	Varicela zoster.
VHB	Hepatocite, limfocite?, macrofage?	Hepatita, carcinom hepatocelular
VHD	Hepatocite	Exacerbarea infecției cronice cu HBV
Papiloma virus	In celulele epiteliale tegumentare	Papiloma, carcinoma
Parvovirus B_{19}	Celulele precursoare ale eritrocitelor din măduva osoasă	Anemie hemolitică aplazică, deficiența cronică a măduvei osoase
Polioma virus BK	Rinichi	Cistita hemoragică
Polioma virus JC	Rinichi, oligodendrocite în SNC	Leucoencefalopatie multifocală
VHC	Hepatocite, limfocite? macrofage?	Hepatita, carcinom hepatocelular
Virusul rujeolei	Neuroni și celule gliale? în SNC	Panencefalita sclerozantă subacută
Rubela virus	SNC	Panencefalita progresivă, diabet-insulino-dependent? artrita juvenilă?
HIV	Limfocite T_{CD4}, monocite, macrofage, microglie,	SIDA
HTLV I	Limfoc I limfocite T	Leucemia celulelor T, polimiozită
HTLV 2	Limfocite T	Necunoscută

Virusurile care *in vitro* produc infecții echlibrate cronice, adică infectează productiv dar nu lizează celula, evoluează ca infecții persistente. Ele nu perturbă echilibrul funcțional al celulei și persistă ca infecții cronice de lungă durată (de exemplu, virusul corio-meningitei limfocitare la șoarece (LCMV) și virusul hepatitei B (VHB).

Infecțiile persistente sunt produse și de virusurile cu potențial litic, când infectează celule nepermisive, sau atunci când se selectează în timp, variante virale mai puțin virulente. Un virus dat poate fi litic pentru unele celule, dar produce infecții echilibrate pentru altele. De exemplu, HIV lizează limfocitele T, dar este mai puțin virulent și litic pentru celulele seriei monocit-macrofag.

20.3.2. Mecanismele persistenței virale

Infecția persistentă corespunde interacțiunii virus-celulă de tip independent echilibrat. In această interacțiune, virusul pare a fi pasiv, adică nu codifică factori inductori ai infecției persistente, spre deosebire de infecția lizogenă fag-bacterie care este modulată de represorul fagic.

Infecțiile latente sunt produse mai frecvent de virusurile cu genom ADN, probabil pentru că celula păstrează mai ușor ADN, fie integrat, fie ca moleculă fizic-independentă.

Virusurile cu genom ADN infectează uneori celulele *nepermisive*, datorită restricțiilor de multiplicare impuse de celula gazdă. Chiar și virusurile care în mod obișnuit lizează celulele permisive, pot infecta persistent diferite tipuri de celule.

Virusurile ARN pot produce infecții cronice în cazul în care virusul se *multiplică continuu* cu o rată scăzută sau când genomul viral *se integrează* în cromosomii celulei și este replicat sincron cu ADN celular.

Persistența virală presupune, ca o condiție obligatorie, *menținerea* virusului sau cel puțin a genomului viral în celula infectată. Dacă celula infectată se divide, genomul viral trebuie să se replice

pentru a nu se dilua în celulele fiice. La retravirusuri, genomul se replică simultan cu ADN al celulei gazdă. Genomul *parvovirusurilor*, ca şi al *retravirusurilor* este integrat într-un cromosom al celulei.

În neuroni (celule care nu se divid), genomul *herpesvirusurilor* se menţine fără să se replice, sub forma unei molecule circulare fizic independente.

Evitarea efectorilor sistemului imunitar. Uneori, virusurile persistente infectează ţesuturi cu statut imunitar privilegiat. SNC este un astfel de ţesut, deoarece bariera sânge-creier limitează traficul limfocitar, iar neuroniii nu exprimă moleculele CMH I şi II şi după o posibilă infecţie nu pot fi detectaţi de limfocite.

Unele virusuri care infectează persistent, exprimă într-o măsură limitată informaţia lor genetică. De exemplu, genele HSV în neuroni nu sunt exprimate, cu excepţia unei regiuni a genomului. In neuronii infectaţi, proteinele virale sunt practic absente, neuronii nu expun la suprafaţă proteine virale şi nu sunt detectaţi de efectorii sistemului imunitar. Dar starea de latenţă este defavorabilă propagării virusului. Latenţa este întreruptă de infecţia productivă în celulele epiteliale permisive.

Epiteliile sunt, de asemenea, situsuri privilegiate imunologic, deoarece efectorii IMC trebuie să traverseze membrana bazală şi bariera endoteliului vascular. Limfocitele au acces limitat la epiteliul tegumentar, la epiteliul nefronilor sau la epiteliile glandelor exo- şi endocrine. Aceste ţesuturi sunt infectate persistent de papovavirusuri.

Poliomavirusurile BK şi *JC* persistă în *rinichi*, cu eliberare virusului progen pentru perioade lungi, *EBV* şi *CMV* – în glandele salivare, iar virusurile *papiloma* persistă în ţesutul epitelial tegumentar.

Virusurile, în special cele cu genom ARN (HIV, VHC), suferă *evenimente mutaţionale* cu o frecvenţă mare, iar în condiţiile presiunii selective de apărare specifică, variantele antigenice apar cu rapiditate. Variaţia antigenică se produce chiar şi la virusurile care infectează persistent, în special la lentivirusuri (de exemplu, virusul anemiei infecţioase equine, virusul Visna al ovinelor, virusul artritei/encefalitei caprinelor, HIV, SIV). Serul de cal infectat neutralizează izolatele virale din episoadele clinice anterioare.

Virusurile care produc infecţii persistente la om (EBV, VHB) generează variante antigenice noi, care scapă mecanismelor recunoaşterii de către limfocitele Tc. Adenovirusul tip 2 are alte mecanisme de a evita contactul cu efectorii sistemului imunitar: proteinele E_3 şi E_{1a} se complexează cu moleculele CMH în citoplasmă şi nu mai sunt transferate pe suprafaţa celulei.

Un alt mecanism al persistenţei virale este inducerea *toleranţei imunitare*. Exemplul clasic este al virusului corio-meningitei limfocitare (LCMV), care, la şoarecii infectaţi *in utero*, elimină selectiv clonele de limfocite reactive şi produce o infecţie persistentă cu viremie, pentru tot restul vieţii. Persistenţa este însoţită de absenţa limfocitelor Tc reactive faţă de antigenele virale. Virusul hepatitei B utilizează aceiaşi strategie a inducerii toleranţei imunitare, prin inundarea organismului cu antigene virale sintetizate în mare exces.

Unele virusuri persistă la nivel populaţional: exemplul clasic este oferit de variantele ce apar prin mecanismele de *shift* şi *drift genetic* ale celor două glicoproteine de înveliş (HA şi NA). Virusul influenza nu produce o infecţie persistentă în organismul uman, dar apariţia sezonieră a variantelor realizează persistenţa în populaţia umană.

20.3.3. Importanţa infecţiilor persistente

Infecţiile persistente cronice creează o stare de purtător, însoţită de eliminarea continuă a virusului, o premisă a transmiterii la gazde noi.

Infecţiile persistente sunt foarte răspândite în natură. Sunt frecvente la animalele de laborator şi prezintă o importanţă practică deosebită, deoarece, după inocularea experimentală cu microorganisme patogene sau cu virusuri, există posibilitatea activării infecţiei latente. Infecţia virală latentă activată poate să modifice particularităţile de patogenitate a agentului inoculat experimental şi chiar să domine tabloul simptomatologic.

Infecţiile persistente sunt răspândite la *artropode* (căpuşe, insecte). Ele reprezintă mari rezervoare de virus în natură, deoarece sunt gazde în care se multiplică virusurile patogene pentru om şi animale.

Numeroase *plante* de cultură sau din flora spontană sunt infectate persistent de virusuri cu spectru de gazdă foarte larg, care infectează alternativ, organismul vegetal şi animal. Ele creează rezervoare necunoscute de virusuri, din care este posibilă evoluţia unor virusuri de mare importanţă clinică pentru om şi animale.

Bibliografie

Ahmed R., Stevens J. G. 1991. *Viral Persistence*, în vol. Fundamental Virology, second edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Nathanson N. 1990. *Epidemiology*, în vol. Virology, second edition, ed. by B. N.Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Stuart-Harris C. 1990. *Epidemiology of viral infections*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Sissons J. G. P., Oldstone B. A. M. 1985. *Host Response to Viral Infections*, în vol. Virology, ed. by B. N. Fields et al., Raven Press, New York.

Tyler K. L., Fields B. N. 1991. *Pathogenesis of Viral Infections*, în vol. Fundamental Virology, second edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Tyler K. L., Fields B. N. 1996. *Pathogenesis of Viral Infections*, în vol. Fields Virology, third edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.

Desselberger U., Gray J. 2004. *Viruses Associated with Acute Diarrhoeal Disease*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Johnston R. T., Greenberg B. M. 2008. *Central Nervous System Viral Diseases*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Green K. Y. 2008.*Noroviruses and Sapoviruses*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

21. FAMILII DE VIRUSURI CU SEMNIFICAŢIE CLINICĂ

21.1. *Familia Orthomyxoviridae*

Prototipul grupului *Orthomyxo* este virusul influenza (gripal) (fig. 389), agentul patogen al gripei umane. Denumirea semnifică afinitatea virionilor pentru mucopolizaharidele şi glicoproteinele membranare ce conţin *acid sialic*.

Virusurile gripale se clasifică în trei tipuri *antigenice* majore, A (1933), B (1940), C (1947), pe baza specificităţii antigenice a *nucleoproteinei* (N) şi a proteinei M. Proteinele celor 3 tipuri nu reacţionează încrucişat cu serul imun specific faţă de una dintre ele. Proteinele N şi M sunt comune pentru toate izolatele care aparţin aceluiaşi tip antigenic.

La microscopul electronic, pe preparatele *colorate negativ*, virionii influenza sunt predominant *sferici*, cu diametrul de 100–120 nm. In preparatele virale obţinute după primul pasaj în oul embrionat de găină, se observă *forme alungite*.

Structura. Virionul este învelit de peplos, derivat din membrana citoplasmatică. Pe suprafaţa învelişului, proemină spicule de *hemaglutinină* (HA) şi *neuraminidază* (NA). Sub peplos se găseşte *corpul central al virionului*, format din *proteina matriceală* (*M*), în care sunt incluse opt molecule de ARN monocatenar, asociate cu *nucleoproteina (NP)* şi cu trei proteine mari, cu funcţie *polimerazică* (*PB_1, PB_2, şi PA*), care catalizează replicarea şi transcrierea ARN.

Cele 3 polimeraze se deosebesc prin compoziţia lor în aminoacizi cu caracter *acid* sau *bazic*.

Genomul este format din *opt segmente* de ARN monocatenar, lineare, cu lungimi diferite (2341–890 nt), asociate cu capsomerele (nucleoproteina), ordonate după o simetrie helicală şi cu moleculele de ARN-polimerază. Primele 12–13 nucleotide la cele două extremităţi ale fiecărui segment genomic se conservă la toate cele 8 segmente genomice şi au rol în interacţiunea cu ARN-polimeraza. Ansamblul ARN-proteine formează *nucleocapsida*.

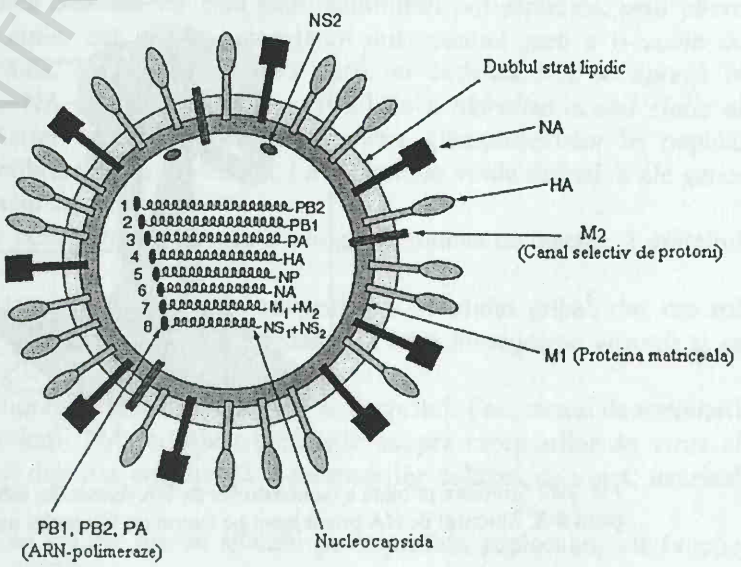


Fig. 389. Ilustrarea schematică a componentelor structurale ale virusului gripal de tip A. In peplos sunt inclavate trei tipuri de proteine: HA, NA şi M_2, cu rol de canal ionic. Proteina M_1 tapetează faţa internă a peplosului, având probabil rol mecanic, dar interacţionează şi cu cele opt ribonucleoproteine cu simetrie helicală. In regiunea centrală a virionului sunt cele opt segmente de ARNmc, având între 2341 şi 890 nucleotide. ARN este asociat cu proteina majoră (NP) şi cu cele 3 ARN-polimeraze (PB_1, PB_2, PA). Sunt indicate proteinele pe care le codifică fiecare segment genomic. Segmentele 7 şi 8 codifică câte două proteine (M_1, M_2, respectiv NS_1, NS_2). NS_1 se găseşte numai în celulele infectate şi are funcţii multiple. NS_2 pare a fi, totuşi, o proteină structurală, în cantităţi foarte mici (adaptat după Lamb R. A. and Krugg R. M., 2001).

Organizarea celor opt segmente genomice de ARN este incertă. Studiile biochimice sprijină ideia că fiecare segment de ARN se găseşte sub forma unui *complex RNP distinct*, dar imaginile

electrono-optice sugerează că regiunea centrală eliberată din virionul parțial dezintegrat, este un *helix unitar, rezultat prin înlănțuirea laxă* a segmentelor genomice, care se desprinde cu usurință din complex.

Moleculele de ARN sunt *lineare*, dar fiecare se pliază și formează o structură de forma unei bucle "în ac de păr". In zonele de complementaritate a bazelor se formează *punți intramoleculare* și aspectul fiecărui fragment este acela de *dublă catenă*. In zonele fără complementaritate, molecula de ARN formează bucle largi.

Virusul influenza de tip C are șapte segmente genomice.

Proteinele virale

Virusurile influenza A și B au două glicoproteine majore de înveliș, *HA* și *NA*, ce proemină sub forma unor spiculi pe suprafața virionului, în număr de 500–1000 și proteina M_2.

Hemaglutinina[*] *(HA)* reprezintă 25% din proteinele virale (fig. 390).

[*] Denumirea de HA a fost dată de Hirst (1947), după ce a observat că în oul embrionat de găină inoculat cu virus gripal, hematiile contaminante ale lichidului alantoidian sunt aglutinate.

Rolul HA este de a se lega de receptorii de suprafață ai hematiilor și ai celulelor epiteliului respirator, realizând faza de *adsorbție* a virionului.

Molecula de HA_o[*] este sintetizată ca o catenă polipeptidică unică, dar după traducerea mesajului este clivată de două ori în cisternele Golgi: inițial este clivată secvența *semnal de 16 aminoacizi* hidrofobi N-terminală, iar *al II-lea clivaj* conferă funcționalitate moleculei de HA. Secvența următoare de 328 aminoacizi formează subunitatea HA_1, iar ultimii 221 formează subunitatea HA_2. Cele două subunități rămân asociate prin legături necovalente și prin punți S-S. Ultimii 25–30 de aminoacizi hidrofobi, la capătul C-terminal al subunității HA_2, au rolul de a ancora molecula în peplosul viral.

[*] Plierea HA_o și asamblarea *in vivo* s-au evidențiat prin experiențe de marcare în puls: celulele infectate cu virus sunt marcate cu un aminoacid radioactiv. Ulterior, la diferite intervale, membranele sunt solubilizate cu detergent și puse în contact cu AMC specifici pentru HA_o monomer și respectiv AMC-anti HA trimer. Imediat după pulsul radioactiv, AMC anti-HA_o precipită toată proteina HA_o. În intervalul următor, o proporție tot mai mare de HA precipită cu AMC specifici anti- HA trimeră. Dinamica marcării în puls a arătat că polipeptidul HA_o necesită 10 min. pentru a se plia și pentru a se încorpora în trimer.

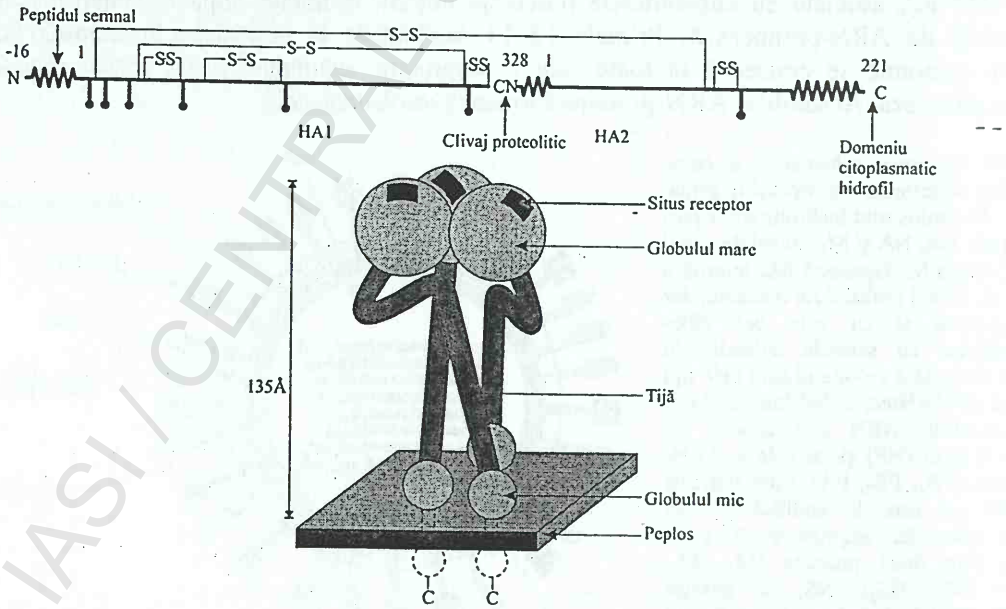


Fig. 390. Structura primară a monomerului de HA format din subunitățile HA_1 și HA_2 legate prin punți S-S. Spicului de HA proeminent pe suprafața virionului este un trimer. Amănunte, în text.

Fiecare monomer, format din subunitățile HA_1 și HA_2 formează o structură alungită, ce constă dintr-un *peduncul* de 80 A, ce se termină printr-o regiune *globulară*, cu diametrul de 40 A, iar la capătul opus, cu o regiune *globulară* de 10 A. Fiecare spicul glicoproteic, vizibil la microscopul

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

electronic, este un *trimer de molecule* de HA. La extremitățile regiunilor globulare mari se găsesc situsurile de atașare la receptorii celulari: o mică depresiune este locul de legare a *sialil-glicolipidelor* și *sialil-glicoproteinelor*. Catenele oligozaharidice localizate pe globulul polar și pe peduncul îi conferă rigiditate și hidrofilie.

Virusurile gripale au tropism accentuat pentru celulele tractului respirator, unde se leagă specific de resturile de acid sialic ale glicoproteinelor membranare. Specificitatea legării de receptori și distribuția tisulară a receptorilor nu explică tropismul, pentru că glicoproteinele și glicolipidele cu acid sialic sunt distribuite în toate țesuturile organismului. Tropismul viral este condiționat de alți doi factori:

– starea de permisivitate a celulei semnifică existența unor factori celulari (neidentificați) care condiționează desfășurarea ciclului de multiplicare;

– absența unui răspuns imun antiviral mediat de IFN.

Neuraminidaza (NA) este un spicul în formă de ciupercă, cu un *cap de formă paralelipipedică*, format din *patru subunități* și *o tijă* ce se termină cu o regiune hidrofobă, inclusă în membrana peplosului. Spiculele de NA nu sunt distribuite uniform pe suprafața învelișului, ci în zone distincte ("petice").

Neuraminidaza este alcătuită dintr-o *singură catenă polipeptidică* de 469 aminoacizi, cu o regiune hidrofobă la capătul N-terminal, prin intermediul căreia se ancorează în peplos. După traducerea mesajului, molecula de NA nu este prelucrată (fig. 391). Ea conține câteva situsuri de glicozilare și numeroase legături S-S stabilizatoare.

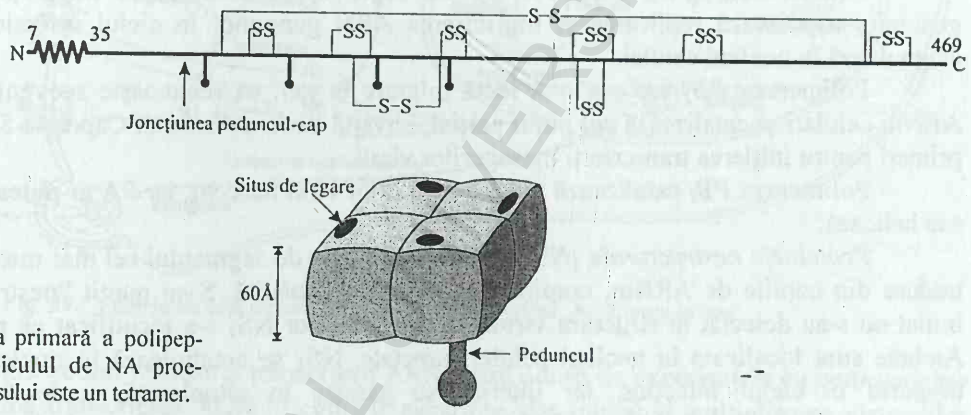


Fig. 391. Sus, structura primară a polipeptidului de NA. Jos, spiculul de NA proeminent pe suprafața peplosului este un tetramer.

Polipeptidele NA se asociază, se pliază și formează *spicule tetramerice*. Tetramerul de NA constă dintr-o *tijă subțire*, ce se termină butonat, iar cele patru subunități polipeptidice, prin pliere formează atât regiunea în formă de cutie, cât și tija butonată. Rolul esențial pare a fi acela de *desializare* a glicoproteinelor din peplos. Virionii mutantelor care nu codifică NA se agregă la suprafața celulei din care înmuguresc. NA este o *sialidază*, cu rolul de a *hidroliza acidul sialic* al glicoproteinelor virale și celulare. Astfel este prevenită încorporarea glicoproteinelor în peplos, agregarea virionilor și este favorizată eliberarea lor din celulă. La mutantele virale defective ale genei NA, catenele glucidice ale HA conțin acid sialic.

O altă funcție atribuită NA ar consta în penetrarea stratului de mucus ce tapetează epiteliul tractului respirator.

Neuraminidaza nu este importantă pentru variația antigenică a virusului gripal, dar are rol important în asamblarea și eliberarea virionilor. Ariile membranare în care înmuguresc virionii și se formează învelișul viral, conțin numai glicoproteine desializate.

In vitro, virionii adsorbiți pe suprafața hematiilor, la 37^0 se desprind. Fenomenul desprinderii se numește *eluție* și se datorează activității NA, cu efect enzimatic asupra receptorilor de virus ai hematiei. Neuraminidaza are are rol în digestia enzimatică a receptorilor celulari de virus, ușurând internalizarea virionului.

Virusul influenza C prezintă un singur tip de spiculi* pe suprafața peplosului, cu funcție *h*emaglutinantă, *e*sterazică și de *f*uziune (HEF).

* Dhori- (7 segmente genomice) și Thogoto- (6 segmente genomice) sunt arbovirusuri și au o singură glicoproteină de suprafață. De aceea ICNV a așezat virusurile influenza tip C, Dhori și Thogoto, într-un gen separat de ortomixovirusurile A și B.

Nucleoproteina este proteina majoră (o moleculă la fiecare 20 nucleotide) care conferă specificitate antigenică de tip *A, B* şi respectiv *C* (denumirea veche este de antigen *S* (solubil) sau antigen *g* (de grup). In timpul infecţiei, NP se acumulează în nucleu. Are atât rol structural, deoarece este asociată cu ARN, cât şi rol în transcriere şi replicare: comută activitatea ARN polimerazei de la sinteza ARNm la ARNc şi ARN genomic.

*Proteina matriceală** (M_1) este cea mai abundentă, neglicozilată şi tapetează interiorul învelişului viral. Se găseşte atât în citoplasmă cât şi în nucleu.

* Proteinele M pot fi eliberate prin tratamentul particulelor virale cu tampon salin şi detergent.

Proteina M_1 este asociată cu *ribonucleoproteina*. Interacţiunile electrostatice multiple ale proteinei M_1 cu complexul ribonucleoproteic, sprijină presupunerea că înmugurirea virusurilor ARN cu genom de polaritate negativă este reglată de această proteină.

Proteina M_2 se sintetizează din acelaşi ARNm ca şi M_1, după clivare şi înnădire. Se integrează, în cantitate mare, în membrana celulei ca *tetrameri*. O cantitate mică se găseşte în peplos. Proteina M_2 are rol important în stadiul timpuriu al infecţiei: funcţionează ca un *canal de protoni* şi permite acidificarea virionului în timpul dezvelirii. Scăderea valorii pH este decisivă pentru eliberarea nucleocapsidei şi pentru succesiunea celorlalte etape ale ciclului de multiplicare virală.

Polimerazele (PB_1, PB_2, *PA*, 30–60 copii/virion) asociate cu nucleoproteina şi cu ARN genomic, catalizează replicarea şi transcrierea ARN genomic. In ciclul infecţios, polimerazele se acumulează în nucleul celulei.

Polimeraza PB_2 are cea mai lentă migrare în gel: ea recunoaşte secvenţele 5' bonetate ale ARNm celulari şi catalizează cel puţin parţial, clivajul *endonucleolitic*. Capetele 5' bonetate au rol de primeri pentru iniţierea transcrierii mesagerilor virali.

Polimeraza PB_1 catalizează alungirea ARNm viral nascent, iar PA ar putea fi o protein-kinază sau helicază.

Proteinele nestructurale (NS_1 şi NS_2), codificate de segmentul cel mai mic al genomului, sunt traduse din copiile de ARNm, continuă şi respectiv, înnădită. S-au numit "nestructurale", deoarece iniţial nu s-au detectat în structura virionului, dar ulterior NS_1 s-a identificat ca proteină structurală. Ambele sunt localizate în nucleul celulei infectate. NS_1 se acumulează în nucleu în cantităţi mari, timpuriu în ciclul infecţios, iar ulterior se găseşte în citoplasmă, unde formează incluziuni paracristaline. Ca şi NP, NS_1 şi NS_2 sunt fosforilate. NS_1, printre cele mai abundente sintetizate în celulele infectate, se leagă de secvenţa poli-A, inhibă clivarea ARN premesager, inhibă exportul nuclear al ARNm celular, asigurând rezerva de molecule de ARNm celular donoare ale primerilor bonetaţi 5' necesari sintezei ARNm virali. Astfel, este blocată expresia genelor celulare. Funcţia majoră a NS_1 este inhibiţia sintezei IFN şi blocarea răspunsului celulei la infecţia virală.

NS_2 se sintetizează în cantităţi mai mici şi apare mai târziu în ciclul infecţios. Este esenţială pentru exportul complexului RNP în nucleu. Nu mai este "nestructurală" pentru că s-a detectat (130–200 molecule) în virionii purificaţi.

Ciclul de multiplicare

Adsorbţia virionilor necesită interacţiunea spiculelor de HA cu resturile de acid sialic ale glicoproteinelor. Se cunosc peste 28 de tipuri de receptori cu acid sialic. Specificitatea interacţiunii este importantă, deoarece diferitele subtipuri de virus influenza se leagă de receptori diferiţi. Dar, patogenitatea este influenţată nu numai de specificitatea receptorului celular, ci şi de alţi determinanţi genetici ai gazdei, ceea ce face ca unele virusuri influenza să depăşească bariera de specie, prin legarea de alţi receptori.

Adsorbţia este urmată de fuziunea învelişului cu membrana endosomului, în condiţiile unui pH acid, în care are loc clivarea finală a HA în HA_1 şi HA_2. La pH acid, proteina M_1 se eliberează din RNP, permiţând complexului ARN-proteine să migreze spre nucleu. Acidifierea mediului în interiorul virionului este mediată de proteina M_2 inserată în peplos, ce are rolul unui canal protonic.

Majoritatea etapelor ciclului de multiplicare se desfăşoară în citoplasmă (fig. 392). Datorită deficienţei funcţionale a polimerazelor virale, care nu pot iniţia sinteza unei catene noi, să boneteze

capătul 3' sau să metileze capătul 5', virusurile influenza au o fază *nucleară** a ciclului de replicare. Proteinele din complexul ribonucleoproteic conțin secvențe de aminoacizi *cariofilici*, ceea ce orientează transportul lor în nucleu, unde are loc transcrierea și replicarea ARN.

*Faza nucleară a virusurilor gripale s-ar datora utilizării *aparatului enzimatic de înnădire a ARNm al celulei* pentru prelucrarea anumitor mesageri virali și nu necesarului de primeri derivați din ARNm celulari.

Transcrierea. Fiecare subunitate genomică codifică sinteza uneia sau două polipeptide. *Mecanismul transcrierii genomului virusului influenza este unic, deoarece necesită cooperarea enzimelor virale și celulare de transcriere.*

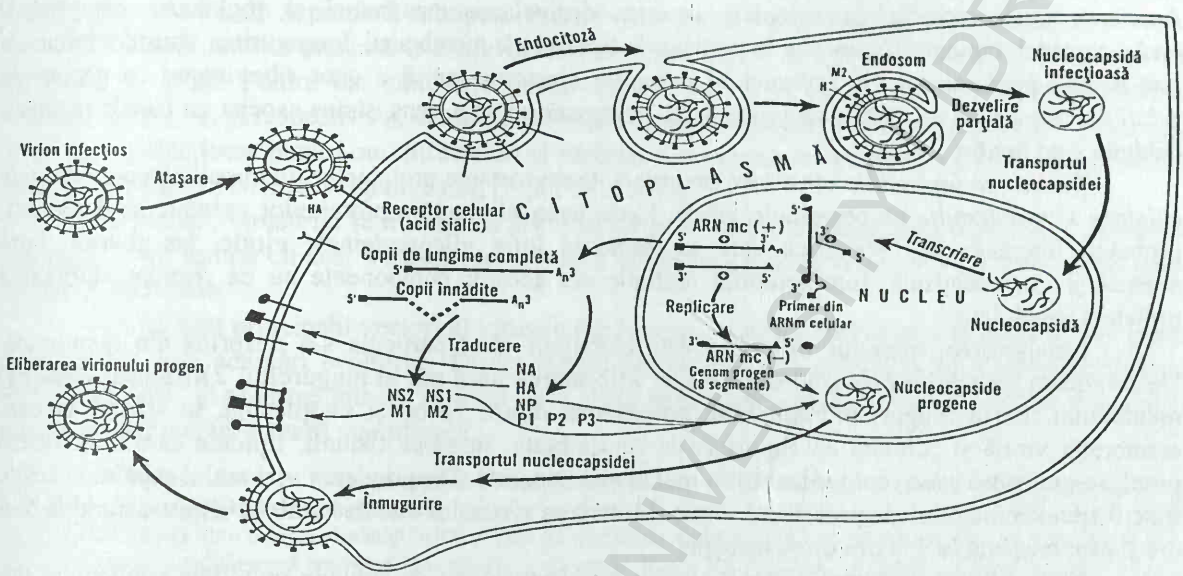


Fig. 392. Etapele ciclului de multiplicare a virusului gripal. Amănunte în text.

Dovada pentru sediul nuclear al transcrierii ARN a fost adusă de experiențele cu *actinomicina D*. Antibioticul inhibă transcrierea ADN în celulele eucariote, dar inhibă și multiplicarea virusurilor influenza, ceea ce contrastează cu lipsa de sensibilitate a multiplicării ribovirusurilor obișnuite.

Sinteza ARNm de influenza necesită primeri bonetați, de 10–13 nucleotide, deoarece polimerazele virale nu inițiază sinteza catenei, ci doar alungesc una preexistentă. *Proteina NS_1* are rol în generarea primerilor bonetați, deoarece are și rol de *endonuclează*. *NS_1 clivează mesagerii celulari la capătul 5', dar se asociază și cu cozile de poli-A și inhibă transportul ARNm celular în citoplasmă.* Astfel, primerii bonetați devin disponibili pentru PB_1 care catalizează sinteza ARNm viral. Primele copii de ARN viral sunt traduse în polimeraze, în nucleoproteină și în proteina NS_1. Acestea sunt transportate în nucleu și au rol în replicarea genomului viral și pentru asamblarea nucleocapsidelor.

Replicarea ARN influenza este strâns corelată cu procesul transcrierii. Replicarea pare a fi *catalizată de PB_1*. Enzima utilizează primerii derivați din ARN celular, care conțin secvența G-C-A. Catena genomică, de polaritate negativă este copiată în catene complementare. Unele catene de polaritate pozitivă, neprelucrate după transcriere, rămân localizate în nucleu și au rolul de matrițe pentru sinteza ARN genomic (de polaritate negativă), pe toată durata ciclului de multiplicare. Alte catene cu polaritate pozitivă sunt prelucrate de enzimele celulei, prin bonetare la capătul 5' și prin legarea secvenței poli-A la capătul 3' și au rolul de mesageri.

ARNm viral este tradus în proteine virale. Unele proteine (HA, NA, proteina M) migrează spre membrana citoplasmatică și se inseră în stratul dublu fosfolipidic, iar altele (polimerazele, NP, proteinele NS) sunt transportate în nucleu.

Asamblarea virionilor. Cele două componente structurale majore ale virusului influenza se asamblează în compartimente celulare diferite: *nucleocapsida se asamblează în nucleu*, iar învelișul se constituie la nivelul membranei citoplasmatice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unităţile structurale ale *nucleocapsidei* (NP, polimerazele) sunt transportate în nucleu, unde se asociază cu *segmentele genomice de polaritate negativă*, iar uneori chiar cu segmente antigenomice. Asamblarea virionilor progeni începe cu legarea NP de ARN viral şi formează RNP. ARNm nu este recunoscut de proteinele nucleocapsidei, ceea ce sugerează că situsurile de iniţiere şi recunoaştere a încapsidării genomului se găsesc numai în ARN genomic şi nu sunt transcrise în copiile de ARNm. RNP ies din nucleu în asociaţie cu M_1 şi NS_2 (denumită proteina de export nuclear – NEP). În *citoplasmă*, RNP se asociază cu proteina M şi sunt orientate spre situsurile membranare de înmugurire, în care s-au încorporat spiculele de NA, HA şi M_2.

Complexul iniţial nucleocapsidă-spicule stimulează legarea mai multor spicule glicoproteice. Asocierea nucleocapsidei cu spiculele produce denivelarea membranei şi înglobarea completă a nucleocapsidei. Înmugurirea are loc în pontoanele lipidice ale membranei. Inmugurirea virusului influenza este reglată predominant, de proteina M_1. Analiza electrono-optică a unor ribovirusuri cu genom de polaritate negativă a evidenţiat că proteina M_1 formează un strat dens, strâns asociat cu lamela internă a dublului strat lipidic.

Formarea învelişului viral este precedată de reasortarea proteinelor, în cursul căreia *proteinele celulare sunt înlocuite* de proteinele virale. Excluderea eficientă a proteinelor celulare se datorează, probabil, interacţiunilor specifice care se formează între glicoproteinele virale, iar ulterior, între acestea şi nucleocapsidă. Interacţiunile multiple ale acestor componente au ca rezultat eliminarea proteinelor celulare.

Înmugurirea virusului influenza este completă când particula s-a desprins din membrană. Desprinderea virionului parcurge două etape: a)formarea unui por al mugurelui; 2)fisiunea (clivarea) membranei. Porul mugurelui reprezintă conexiunea dintre virion şi citoplasmă, în stadiul în care membrana virală şi celulară au raporturi de continuitate. In etapa fisiunii, lipidele care delimitează porul, se amestecă şi se reorganizează în membrane separate. Desprinderea virionului pare să necesite funcţii speciale mediate de proteinele virale. Eliberarea virusului este detectabilă ultrastructural la 5–6 ore şi este maximă la 7–8 ore după infecţie.

ECP. Situsul principal al multiplicării este reprezentat de celulele epiteliale columnare, dar virusul gripal se poate multiplica în tot tractul respirator. Celulele se vacuolizează, pierd motilitatea cililor, mor, se descuamează.

Virusul de tip A infectează omul, porcul, calul şi câteva specii de păsări: curcă, raţă, gâscă.

Virusul de tip B, în condiţii naturale, infectează numai omul, iar virusul C s-a izolat de la om şi porc.

Cultivare. Virusurile influenza se cultivă în oul embrionat de găină sau în culturi celulare primare. Adăugarea tripsinei în culturile de celule permite virusului să se multiplice în liniile celulare canine (MDCK – Madin Darby canine kidney). Pentru obţinerea vaccinului gripal, virusul se cultivă în oul embrionat de găină. Multiplicarea se evidenţiază prin capacitatea sa de a aglutina hematiile de cocoş. Virusul obţinut după pasajul iniţial aglutinează hematiile de cobai la diluţii mai mari ale preparatului, dar prin pasaje succesive, virusul aglutinează hematiile de cocoş la un titru superior. Schimbarea capacităţii de a aglutina eritrocitele se numeşte *variaţie O – D* (O = izolat original; D = derivat).

Epidemiologie

Infecţia gripală are caracter epidemic. Epidemia semnifică izbucnirea unei maladii infecţioase cu localizare circumscrisă (oraş, ţară). Epidemia începe brusc, atinge un maxim la 2–3 săptămâni, durează 5–8 săptămâni şi cuprinde o grupă de vârstă. Pandemia* este o epidemie cu extindere transcontinentală şi cuprinde majoritatea grupelor de vârstă.

* Pandemia din 1889–1891 a fost determinată de un virus asemănător H_3. Cele 3 pandemii majore ale sec. XX: *spaniolă* (1918), originară în China, produsă de H_1N_1; *asiatică* (1957), cauzată de H_2N_2; *Hong Kong* (1968) declanşată de H_3N_2. In '77 a revenit H_1N_1, foarte asemănător cu H_1N_1, care a circulat în anii '50. Din 2001 s-a izolat un reasortant H_1N_2, iar din 1997, un virus patogen aviar (H_5N_1) a infectat milioane de păsări domestice şi până în martie 2007 infectase 278 persoane, dintre care 168 decese. (Patologia pneumoniei produsă de H_5N_1 este un alt exemplu de răspuns imun înnăscut scăpat de sub control, amplificat de citokinele eliberate de macrofage şi CD). In 2007, H_1N_1 circula împreună cu H_3N_2. Cea mai severă pandemie a fost cea din 1918–'19, cu un mare număr de victime (40–50 milioane, mai ales adulţi tineri), fapt care a stimulat cercetarea.

(Numărul victimelor este mult mai mare, fiindcă multe ţări nu au înregistrat victimele – URSS postrevoluţionară. În Africa subsahariană au murit circa 1,5 milioane persoane, iar în India a dispărut o generaţie întreagă).

Virusul nu dispare, ci se menţine în populaţie prin transmitere directă de la o persoană la alta. Nu există dovada infecţiei latente sau persistente a indivizilor umani.

Epidemiile variază ca severitate (virulenţă), dar de obicei produc mortalitate la vârstnici.

Virozele sunt însoţite, în general, de o *imunitate solidă*, dar cea antigripală are un efect protector minim şi de aceea epidemiile de gripă sunt însoţite de mortalitate ridicată la cei doi poli ai vârstelor.

În natură, virusul de tip A infectează omul, porcul, calul, mamiferele de apă şi păsările. În izolatele de virus de tip A, de la om şi animale s-au identificat *16 variante antigenice* (subtipuri) ale *HA* (H_1-H_{16}) şi *9 variante antigenice* ale *NA* (N_1-N_9), pe baza absenţei reacţiei serologice încrucişate. Numai virusurile de tip A prezintă subtipuri. Primul virus gripal s-a izolat de la porc (1930).

Varianta umană prezintă o mare diversitate genetică şi antigenică, ce stă la baza marilor epidemii de gripă. Pentru om sunt infecţioase numai H_1, H_2 şi H_3 şi N_1, N_2, corespunzătoare subtipurilor A_1, A_2 şi respectiv A_3, ce diferă prin specificitatea antigenică a hemaglutininei. Toate cele 3 subtipuri infecţioase pentru om, infectează şi păsările şi de aceea se consideră că ele sunt rezervorul natural, furnizând variante antigenice noi, ce pot trece la om.

La păsări*, virusurile se multiplică preferenţial în celulele *tractului intestinal*, dar şi în tractul respirator, fără semne clinice. Virusul este eliminat la titru înalt, prin fecale şi prin ciclul fecal-oral, ajunge la *mamifere*.

Raţele sunt principalii vectori ai virusului influenza. Absenţa virulenţei influenza la raţă poate fi rezultatul unei adaptări evolutive. Puţine tulpini produc infecţia sistemică la păsări, asociată cu implicarea SNC şi moartea într-un interval de o săptămână. Cele virulente sunt H_5 şi H_7. Prin ciclul fecal-oral, virusul infectează mamiferele.

* Virusurile aviare cu virulenţă scăzută se multiplică numai în tractul respirator şi produc infecţie respiratorie de intensitate medie iar cele cu virulenţă înaltă (produc mortalitate ridicată) se multiplică şi în alte situsuri decât tractul respirator. Diferenţa între cele cu virulenţă înaltă şi cele cu virulenţă scăzută rezidă în şansa clivării HA_o în subunităţile HA_1 şi HA_2. Clivarea condiţionează activarea HA, are loc extracelular şi este catalizată de proteazele de tipul tripsinei asociate secreţiei mucoase a tractului respirator şi gastro-intestinal. Clivarea HA_o este esenţială pentru ciclul de multiplicare deoarece generează domeniul de fuziune a învelişului viral cu membrana endosomului. Cele cu virulenţă scăzută au un singur rest de aminoacid bazic la situsul clivării moleculei precursoare al HA (HA_o), astfel încât şansa clivării scade. Subtipurile aviare înalt virulente conţin resturi bazice multiple la situl de clivare. Apariţia aminoacizilor bazici multipli la situsul de clivare, prin procese mutaţionale, măreşte şansa ca precursorul HA_o să fie clivat de enzime cu distribuţie tisulară ubicvitară, ca de exemplu, *furina*. Virusurile cu virulenţă înaltă se pot multiplica chiar în creier, rezultând o infecţie ce se disemineză fulminant în alte ţesuturi, cu mortalitate înaltă.

Pe de altă parte, dobândirea unei catene glucidice la situsul de clivare poate bloca accesul proteazelor

Dacă HA nu este clivată, virusul se poate lega de receptorii celulei, dar nu iniţiază o infecţie productivă.

Virusurile aviare produc focare de infecţie la focă, balenă, porc şi la păsări domestice (găină, curcă), dar nu se propagă cu uşurinţă la om. De aceea, se presupune că reasortarea segmentelor genomice se face la *porc*, o specie care are receptori ai celulelor epiteliale pentru tulpinile virale umane şi aviare.

Epidemia cu virusul aviar H_5N_1 a izbucnit în 2003, cu pierderi economice uriaşe, dar s-a transmis şi la om, cu consecinţe letale. Creşterea industrială intensivă a puilor de găină şi a curcilor, comercializarea pe scară mare şi transportul păsărilor vii şi a produselor pe distanţe mari a uşurat propagarea virusului. Virusurile aviare nu infectează eficient omul şi celelalte primate, iar virusurile umane nu se multiplică eficient la curcă, datorită mai multor factori ai gazdei şi ai virusului. Unul dintre factorii virali este *specificitatea de receptor*. Astfel, virusurile influenza umane se leagă de acidul sialic (AS) legat de galactoză prin legătură α-2,6, iar virusul influenza aviar are afinitate pentru AS legat de galactoză prin legătură α-2,3. Specificitatea de receptor este unul dintre factorii ce condiţionează bariera de specie. S-a evidenţiat că celulele epiteliale ale tractului respirator inferior uman (bronhiole terminale şi celulele epiteliale alveolare) au receptori AS α-2,6 şi α-2,3. NA virusurilor aviare hidrolizează cu predilecţie receptorul aviar AS α-2,3.

Patologia infecţiei cu H_5N_1 este diferită de a virusului influenza uman: diaree, disfuncţie renală şi hepatică, limfopenie severă, hemofagocitoză intensă, ceea ce sugerează infecţia mai multor organe. Virusul aviar se disemineză dincolo de tractul respirator şi induce eliberarea în exces a citokinelor. Tulburările diareice sugerează că virusul se multiplică în tractul gastro-intestinal, fie de la începutul procesului infecţios sau intestinul este implicat tardiv prin diseminare ulterioară.

Epidemiologia virusurilor gripale are explicaţii genetice şi se datorează *mecanismelor de variabilitate*. Variabilitatea genetică a virusului gripal A se produce pe două căi :

- printr-o rată înaltă a *mutaţiilor punctiforme*, care produc fenomenul de *drift antigenic;*
- prin fenomenul cunoscut sub denumirea de *shift genetic* (*shift*, lb. engleză = schimbare).

Shiftul genetic

Shiftul genetic este un proces de *variație genetică amplă*, asociată cu modificarea a peste 20% din totalul aminoacizilor HA. Shiftul se produce numai la tulpinile de virus influenza A și are 3 explicații:

– *reasortarea*[*] *segmentelor genomice* de la tulpini de virusuri cu specificități distincte de gazdă;

[*] Adeseori, în locul termenului de reasortare, se folosește, în mod greșit, cel de recombinare. Recombinarea este un fenomen rar, datorat ARN-polimerazei, care își schimbă matrița. Recombinarea a dus la inserția secvenței de nucleotide nevirale în gena HA.

– *trecerea unei tulpini de virus de la animale* (păsări, mamifere), care devine infecțios pentru om. Cele mai multe virusuri au o capacitate mică sau nulă de a se propaga la contacții umani, dar pandemia spaniolă (1918) a fost produsă de virusul care a trecut de la porc;

– *schimbări mutaționale masive* care se produc într-o perioadă scurtă de timp și generează un virus nou.

Reasortarea genetică este consecința infecției simultane a unei gazde naturale cu două tulpini virale, distincte genetic și antigenic. Cele opt segmente de ARN ale genomului influenza A sunt *independente fizic* unul de altul și, teoretic, se comportă asemănător cromosomilor unei celule eucariote în timpul diviziunii. În virion, ele se asociază prin *interacțiuni* a căror natură nu se cunoaște.

Porcul este de cele mai multe ori, gazdă intermediară comună pentru virusurile influenza aviar și uman, unde are loc reasortarea segmentelor genomice.

Infecțiile experimentale mixte la animale de laborator cu variante biochimice și antigenice distincte ale NA, au generat un virus progen "hibrid", cu caracteristicile biochimice și antigenice ale ambelor linii parentale, ceea ce denotă capacitatea accentuată a acestui virus de a-și modifica informația genetică.

[*] Porcul se infectează cu virusurile umane (H_1N_1 și H_3N_2) prin inhalarea aerosolilor în timpul contactului strâns, iar omul poate să se infecteze cu virusul de la porc.

În celulele infectate simultan cu două tulpini virale – aviar și uman, segmentele genomice se *redistribuie* în virionii progeni și rezultă combinații de segmente genomice ale ambelor linii parentale. Fenomenul schimbului reciproc de segmente genomice de ARN s-a denumit *reasortare genică* și trebuie deosebit de conceptul tradițional al *recombinării genetice*, în cursul căruia, genele se redistribuie prin fenomenul de *crossing-over*.

Genomul segmentat favorizează schimbul genelor în cazul infecțiilor mixte, în absența recombinării ARN. Reasortarea genomică a diferitelor variante genetice de virus gripal este comună, dar de cele mai multe ori este nefuncțională. Emergența unei noi tulpini de virus infecțios este limitată de *probabilitatea mică a interacțiunilor eficiente între segmentele genomice diferite*. Virionii progeni conțin tot opt segmente de ARN, dar de origini diferite[*].

[*] H_2N_2 (agentul gripei asiatice din '57) a dobândit 3 segmente genomice (PB_1, HA, NA) de la virusul influenza aviar și a păstrat 5 gene de la virusul uman, iar virusul din '68 a dobândit 2 gene (PB_1 și HA) de la virusul aviar.

Reasortarea segmentelor genomice duce la *apariția unui nou subtip de virus* influenza A, care conține o nouă HA sau o nouă HA și o nouă NA, distincte antigenic de cele care au circulat anterior. HA noii tulpini diferă prin aminoacizii săi în proporție de 25–30% de tulpina anterioară.

Apariția unui nou *subtip antigenic* corespunde unei mari *pandemii*[*] de gripă. Pandemiile și epidemiile de gripă au fost cauzate de 3 subtipuri diferite ale virusului de tip A: H_1N_1, H_2N_2, H_3N_2.

[*] Pandemia este un proces infecțios ce apare într-o regiune geografică specială, se răspândește pe areale foarte largi și infectează un procent mare al populației, fiind produsă de o tulpină de virus care nu apare prin mutație din tulpinile circulante anterior.

Reasortările genetice sunt net superioare ca frecvență, fenomenelor de recombinare și au rol esențial în determinarea ratei înalte a variației genetice și antigenice naturale a virusului influenza.

Fenomenul reasortării genetice a virusului gripal explică gravitatea epidemiilor, deoarece *reacţiile imunitare* protectoare ale organismului sunt stimulate de antigenele virale cele mai variabile: HA şi NA.

Populaţia umană este lipsită de protecţie imunitară faţă de noile variante genetice şi antigenice.

Următoarea pandemie majoră de gripă se va datora *reasortării genetice* a virusului gripal sau este posibilă *revenirea unei variante genetice* mai vechi, care se va propaga într-o populaţie căreia îi lipseşte memoria imunitară.

Pandemiile de gripă au avut originea în sudul Chinei, o zonă cu climă caldă şi cu o mare densitate a populaţiei umane şi animale, unde infecţia gripală se produce tot timpul anului.

Virusurile de tip B şi C nu suferă shiftul antigenic, probabil pentru că le lipseşte rezervorul animal, dar sunt supuse driftului antigenic.

Driftul genetic

Variaţia antigenică de amploare limitată, a virusurilor gripale, este consecinţa unei forme mai puţin dramatice a variaţiei genetice, dar produce epidemiile anuale de gripă. Driftul* (glisare) este *variaţia antigenică de mică amploare*, în cadrul căreia se păstrează *relaţiile serologice încrucişate unidirecţionale* cu varianta antigenică precedentă. Glisarea antigenică este continuă pe toată durata existenţei unui subtip în populaţia umană.Variantele antigenice ce corespund subtipurilor de virusuri influenza A sunt supuse unui proces de *variaţie antigenică sezonieră limitată*. In fiecare an, virusul circulant este uşor diferit de varianta precedentă.Variaţia antigenică sezonieră a HA este restrânsă (< 1% din totalul aminoacizilor), dar suficientă pentru ca anticorpii specifici faţă de *varianta precedentă a virusului, să nu neutralizeze noua variantă antigenică*. Sub denumirea de drift sunt cuprinse toate variantele antigenice datorate modificării a mai puţin de 1% din totalul aminoacizilor HA.

* Dovada driftului a fost adusă prin analiza virusului produs timp de 10 luni de un copil cu imunodeficienţă severă combinată (SCID), infectat cu virus tip A. Pe parcursul celor 10 luni s-au izolat virusuri care relevă o variaţie continuă, genetică şi antigenică, în absenţa presiunii selective a răspunsului imun, cu excepţia posibilă a celulelor NK. S-au observat schimbări multiple ale nucleotidelor şi aminoacizilor HA şi NP.

Driftul antigenic este rezultatul acumulării *mutaţiilor punctiforme* prin substituţie, deleţie sau inserţie în fiecare dintre cele opt segmente genomice. Rata erorii* de replicare a ARN este de ordinul $1/10^4$ baze, datorită absenţei activităţii de *corectare a erorilor* (proof reading) a ARN-polimerazelor virale.

* Pentru comparaţie, rata erorilor de replicare a ADN, catalizată de ADN-polimeraze este mult mai mică: $1/10^9$–10^{10} baze/ciclu.

Fiecare rund de replicare a ARN viral duce la apariţia unei populaţii mixte, cu multe mutante, majoritatea nefavorabile, dar unele mutaţii sunt avantajoase şi devin dominante în condiţiile presiunii selective a răspunsului imun.

Toate cele 3 tipuri de virusuri gripale (A, B, C) suferă driftul antigenic, dar shiftul genetic se produce numai la virusurile grupului A, deoarece numai ele au o gazdă animală, virusurile B şi C infectează numai omul. Rata driftului la virusurile grupului B este mai mică decât la grupul A; iar virusurile grupului C sunt relativ stabile din punct de vedere genetic şi antigenic.

Datorită variaţiilor antigenice de mare amplitudine, consecinţe ale reasortărilor genetice sau variaţiilor de mică amploare prin fenomenul driftului genetic, infecţia *gripală nu se poate eradica.*

Intervalul dintre valurile epidemice de tip A este de 2–3 ani, pentru cele produse de virusuri de tip B, de 3–6 ani, iar pentru pandemiile datorate unui nou subtip de virus A este de ordinul decadelor.

Epidemiologie. Virusul se transmite de la o persoană la alta prin aerosoli, prin contactul cu mâinile sau cu suprafeţele contaminate. Virusul A infectează copiii şi vârstnicii, dar diferă de virusurile de tip B şi C prin caracterul antigenic mereu schimbător. Virusul B produce infecţii respiratorii mai uşoare decât virusul A. Virusul C produce rare epidemii respiratorii la copii. Majoritatea virionilor sunt inactivaţi de barierele protectoare nespecifice: IgA sau inhibitorii nespecifici din secreţiile mucoasei. Un număr mic de celule epiteliale sunt infectate de virionii din aerosoli. Virionii progeni infectează celulele adiacente, iar NA virală scade vâscozitatea mucusului ce acoperă epiteliul şi expune receptorii suprafeţei celulare. Într-un interval scurt este infectat un număr mare de celule, care se lizează.

Patogenitate. Perioada de incubație este de 1–4 zile, în funcție de cantitatea de virus infecțios și de starea imunitară a gazdei. Eliberarea virusului începe în ziua ce precede apariția simptomelor, atinge valoarea maximă după 48 de ore și scade progresiv în următoarele 5 zile. Leziunile celulelor epiteliale favorizează infecția cu *Staphylococcus, Streptococcus, H. influenzae*. Creșterea sensibilității pacienților la suprainfecțiile bacteriene se atribuie pierderii funcției de clearance a cililor celulelor epiteliale, disfuncției celulelor fagocitare și existenței exudatului alveolar, un mediu optim pentru creșterea bacteriilor. Pneumonia mixtă, virală și bacteriană, este mult mai frecventă decât pneumonia primară. Co-infecția cu *S. aureus* ridică rata mortalității, deoarece bacteria secretă o protează ce clivează HA, favorizând multiplicarea virusului.

Virusurile influenza, în mod obișnuit, rămân limitate la tractul respirator, pentru că enzimele proteolitice ce clivează HA sunt comune numai la acest nivel. S-au identificat virusuri mai virulente, a căror HA este clivată de o enzimă ubicvitară – *plasmina*, iar tulpinile virale produc infecții tisulare mai extinse.

Debutul procesului patologic este brusc: febră marcată, dureri de cap, fotofobie, tuse uscată, senzație de frig. Febra și tusea cu debut brusc disting influenza de alte infecții respiratorii, de răceala comună. Spectrul simptomelor gripale este foarte variabil: de la infecția respiratorie medie, cu rinită ori faringită, până la pneumonie virală primară cu sfârșit letal. Pneumonia poate fi secundară, datorată infecției bacteriene.

Infecțiile inaparente pot avea aceiași frecvență cu cele simptomatice.

Mialgia este o trăsătură caracteristică a infecției cu influenza, dar poate să fie însoțită de miozită și mioglobinurie: mușchii sunt dureroși și duri la atingere, dar simptomele neurologice nu sunt evidente. În ser, transaminazele și creatin-fosfokinaza cresc, iar examenul histologic al biopsiei musculare relevă necroza fibrelor musculare și infiltrarea celulelor mononucleare.

Pentru dianosticul clinic ferm este necesară confirmarea laboratorului.

Virusul se izolează din secrețiile respiratorii și rareori din sânge în:

– *oul embrionat* de găină de 10 zile, prin inocularea probei (secreție nazofaringiană) în cavitatea amniotică sau alantoidiană. Inainte de recoltarea virusului, ouăle se păstrează la 33–34°.

– *celulele tulpinii MDCK* sau în culturi primare de rinichi de maimuță, dar au dezavantajul infecției naturale cu virusuri vacuolante;

– celule de rinichi de cal, hamster sau rinichi de pui de găină.

La adult, simptomele clinice includ febra, frisoane, dureri de cap, tuse uscată, dureri în gât, febră de până la 41°, ce crește în 24 de ore.

Starea febrilă durează 1–5 zile, cu o medie de 3.

Răspunsul imun. După infecția naturală sau după vaccinare se sintetizează Ac anti-HA, NA, NP și M, cu specificitate de *subtip*. Ag virale stimulatoare ale RI protector au fost identificate după injectarea separată a proteinelor virale purificate la animale. Anticorpii anti-HA neutralizează infecțiozitatea virionilor, iar anticorpii anti-NA au efect neutralizant nesemnificativ. *Nucleoproteina* induce sinteza anticorpilor specifici, numai dacă este sintetizată în exces și eliminată extracelular. Ac anti-M și anti-NP pot contribui la efectul protector, dar nu sunt factori majori.

Rezistența la infecția gripală se corelează cu titrul seric al Ac anti-HA și cu sIgA la nivelul mucoasei respiratorii. Anticorpii RIP sunt IgG, A, M, iar ai RIS sunt IgG, IgA. Anticorpii neutralizanți se leagă la un situs al HA, foarte apropiat de situsul prin intermediul căreia HA se leagă de acidul sialic. Anticorpii serici anti-HA persistă timp de decade. După driftul antigenic, Ac față de varianta anterioară sunt protectori într-o măsură importantă față de noua variantă antigenică și infecția este mai ușoară. Infecțiile sau imunizările succesive amplifică răspunsul imun față de primul subtip cu care s-a produs infecția sau imunizarea, fenomen denumit "amintirea păcatului antigenic originar".

RIMC cu activarea limfocitelor CD_4 și CD_8 are specificitate de tip, dar este protector față de toate subtipurile de influenza A și produce liza celulelor infectate.

Vaccinul. Imunizarea organismului cu vaccin viral nu conferă protecție față de infecția cu alte serotipuri, pentru că hemaglutininele lor nu dau reacție încrucișată.

Vaccinul trebuie să conțină Ag tulpinilor virale izolate recent. De aceea, conținutul vaccinului se modifică anual, în funcție de specificitatea antigenică a tulpinilor care apar sezonier.

În luna februarie a fiecărui an, WHO face evaluări privind proprietățile antigenice ale tulpinilor de virus gripal care vor circula în sezonul următor, bazate pe datele de analiză genomică, furnizate de 3 centre (Atlanta, Londra, Melbourne), la care se adaugă datele furnizate de laboratoarele naționale. Obiectivul este împerecherea proprietăților antigenice ale HA și NA ale tulpinii recomandate pentru vaccin, cât mai apropiată de acelea ale liniilor care emerg și este posibil să circule în sezonul următor.

Vaccinul de influenza este *trivalent*, cu 2 tulpini de influenza A și o tulpină B. Se folosesc 3 tipuri de vaccin inactivat:

- *vaccinul cu virus întreg* se prepară prin inocularea tulpinilor de virus circulante în oul embrionat de găină. Tulpinile celor 3 virusuri circulante, A (H_3N_2 și H_1N_1) și B care au circulat în ultimul sezon se cultivă în oul embrionat. Lichidul alantoic se recoltează după 2–3 zile de la incubare, se concentrează prin centrifugare zonală și se purifică, se inactivează cu formalina sau cu β-propiolactonă și se standardizează conținutul de HA pentru inoculare intramusculară. Cele 3 tulpini virale se amestecă pentru realizarea cantității de 15 μg HA a fiecărui virus, în fiecare doză. Vaccinul conține albumină și se administrează grupelor de vârstă cu risc înalt și celor care propagă virusul (personalul de îngrijire medicală) la cei cu risc înalt. Titrul Ac serici persistă la nivel protector 1–5 ani în funcție de tulpina de virus și de vârsta persoanei. Datorită driftului antigenic, Ac induși de vaccin devin mai puțin eficienți față de noile tulpini;
- *vaccinul cu virus dezagregat* sub acțiunea unui detergent sau a unui solvent organic. Virusul recoltat se tratează cu detergent pentru ruperea învelișului;
- vaccinul cu antigenele de suprafață – HA și NA purificate, fără ARN și proteine asociate. Se administrează ca suspensie apoasă.

După prima administrare, la persoanele care nu au experiența antigenică cu o tulpină asemănătoare de virus, răspunsul imun primar este protector, dar Ac diminuează la un titru subprotector după 6–7 luni. La cei vârstnici, cu experiență imunitară față de variante antigenice asemănătoare, răspunsul imun secundar este prompt și de lungă durată.

Vaccinul inactivat nu stimulează sinteza sIgA (din mucoase). Virusul de tip sălbatic se poate multiplica în epiteliul mucoasei nazale, dar Ac serici protejează față de invazia virală a tractului respirator inferior. Vaccinurile protejează 70–90% de efectele morbide pe termen scurt.

Vaccinul atenuat obținut prin pasaje succesive în oul embrionat de găină, prin mutație sub acțiunea factorilor chimici sau prin cultivare la temperatură mai mică (adaptare la rece). Administrat la voluntari, vaccinul atenuat nu a produs simptome clinice semnificative. Dezavantajul este că obținerea mutantelor necesită un interval de timp mai mare decât rata apariției noilor mutante sezoniere. Virusul atenuat poate să reverseze la varianta virulentă.

Virusurile *atenuate* rezultate prin una dintre metodele de mai sus se amestecă cu virusul de tip sălbatic, cu scopul de a produce reasortanți genomici (virusuri hibride), care conțin fragmente de ARN ce codifică HA și NA ale virusului sălbatic, iar toate celelalte gene derivă de la tulpina atenuată. Virusul adaptat la rece se multiplică eficient în nazofaringe după administrarea intranazală, dar nu se multiplică în mediul mai cald al țesutului pulmonar și induce imunitate protectoare locală anti-HA și anti-NA, de scurtă durată. Are avantajul administrării ușoare.

O abordare nouă constă în *clonarea genelor ADNc* care codifică Ag relevante, în vehicule adecvate expresiei genice. Vaccinul ar fi mai ușor disponibil și nu ar fi condiționat de cultivarea în oul embrionat.

Efectele adverse (inflamația locală, febră) determină reținerea față de vaccinare. Totuși, vaccinul este recomandat persoanelor cu risc înalt.

Vaccinurile *subunitare* sunt slab imunogne.

Bibliografie

Webster R. G., Doherty P. C., Tripp R. A. 1998. Influenza virus (Orthomyxovirus), Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Lamb R. A., Krugg R. M. 2001. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Murphy B. R. 1996. Orthomyxoviruses, în vol. Fields Virology, third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Cox N. J., Kawaoka Z. 1998. Orthomyxoviruses: Influenza, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.
Hay A. J., Skehel J. J. 1979. Influenza Virus Transcription – British Medical Bulletin, vol. 35, no. 1, pp. 47–50.
Hinshaw V. S., Olsen C. W., Dybdahl-Sissoko N., Evans D. 1994. Apoptosis: a Mechanism of Cell killing by Influenza A and B Viruses – Journal of Virology, 1994, vol. 68, no. 6: 3667–3673.
J. S. Oxford and G. C. Schild 1990. The Orthomyxoviridae and influenza, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.
Murphy B. R, Webster R. G. 1990. Orthomyxoviruses, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Kingsbury D. W. 1991. Orthomyxoviridae and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Malik Peiris J. S., Menno D. de Jong, Guan Yi. 2007. Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health – Clin. Microbiol. Rev. April, 20: 243–267.
Shaw M. W., Arden N. H., Maassab H. F. 1992. New aspects of influenza viruses – Clin. Microbiol. Rev. January, 5, 1, 74–92.
Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses – Microbiol. Rev, 56(1): 152–179.
Lamb R. A. 2008. Influenza, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.2. Familia *Paramyxoviridae*

Familia *Paramyxoviridae* (*para* = alături de) cuprinde virusuri al căror genom este reprezentat de o catenă unitară de ARN, de polaritate *negativă*. Familia cuprinde 4 genuri şi reprezentanţii ei infectează numai organismele cu sânge cald, ceea ce dovedeşte că au o evoluţie recentă: *Paramyxo-*, *Morbili-*, *Rubula-*, *Pneumovirus* (fig. 393). Distribuţia în cele 4 genuri s-a făcut pe baze serologice (membrii fiecărui gen dau reacţii încrucişate) şi a diferenţelor funcţionale ale spiculelor de suprafaţă (HA şi NA). Virusurile care se fixează pe celulă prin glicoproteinele cu acid sialic au spicule cu activitate NA.

La g. *Paramyxovirus* şi *Rubulavirus* spiculele au activitate HA şi NA (aglutinează eritrocitele aviare şi ale mamiferelor) şi s-au numit proteina *HN*;

g. *Morbilivirus* are numai activitate HA şi spiculele se numesc proteina *H;*

g. *Pneumovirus* nu are activitate HA şi nici NA şi spiculele s-au numit proteină *G*.

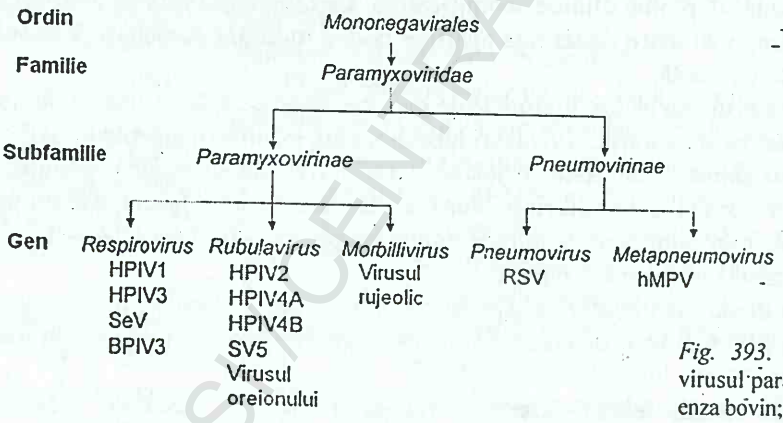


Fig. 393. Clasificarea paramixovirusurilor (HPIV = virusul parainfluenza uman; BPIV = virusul parainfluenza bovin; SeV = virusul Sendai; SV = virusul simian).

Structura. Virionul este alcătuit din două module structurale: o regiune centrală ribonucleoproteică, în care se găseşte genomul ARN monocatenar, asociat cu câteva tipuri de proteine, formând împreună *nucleocapsida* cu simetrie helicală, acoperită de *peplos*, un înveliş lipoproteic extern derivat din membrana citoplasmatică a celulei (fig. 394).

Virionii sferici au diametrul cuprins între 150–250 nm, dar în preparatul viral se găsesc şi particule mai mari (până la 400 nm), pleomorfe sau filamentoase. Variaţiile dimensionale reflectă absenţa relativă a controlului morfogenezei virale în stadiul de înmugurire. Virionii mari pot să conţină doi sau mai mulţi echivalenţi genomici. Formele filamentoase, cu diametrul extern de 18 nm şi

cel intern de 4 nm, rezultă prin ruperea învelişului viral şi despiralizarea nucleocapsidei şi sunt structuri flexibile: se despiralizează în prezenţa concentraţiei crescute de săruri şi se spiralizează când forţa ionică a soluţiei scade.

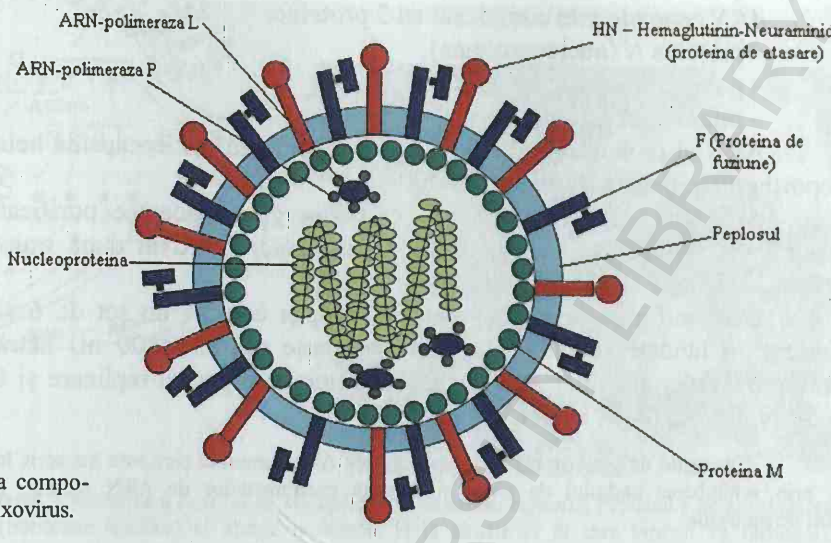


Fig. 394. Ilustrarea schematică a componentelor structurale ale unui paramixovirus.

Virusurile cu genom ARN monocatenar de polaritate negativă (*Mononegavirales*: *Paramyxo-Rhabdo-* şi *Filoviridae*) au o trăsătură morfologică generală şi anume *aspectul scămos* al suprafeţei, datorat prezenţei spiculilor glicoproteici care mediază ataşarea şi pătrunderea lor în celulă.

Prin tehnica coloraţiei negative pentru microscopia electronică, învelişul viral se rupe şi eliberează nucleocapside filamentoase helicale sau colorantul pătrunde prin peplos şi evidenţiază conturul nucleocapsidei.

Aspectul sferic al virionilor derivă din faptul că în nucleocapsidă, capsomerele realizează interacţiuni laxe, ceea ce permite un grad ridicat de flexibilitate a acesteia. Fiecare unitate de structură a nucleocapsidei este flexibilă. Polipeptidul fiecărei capsomere are *două domenii*: N-terminal, ce cuprinde 2/3 ale moleculei şi are *raporturi directe cu ARN genomic*; domeniul C-terminal, orientat spre *suprafaţa nucleocapsidei*. Zona de joncţiune a celor două domenii, sensibilă la proteaze funcţionează ca o 'articulaţie' (balama), la nivelul căreia *molecula se deformează* şi dobândeşte o altă configuraţie spaţială. Zona 'balama' este sensibilă la acţiunea tripsinei. Datorită flexibilităţii fiecărei capsomere, nucleocapsida se împachetează în interiorul învelişului.

Glicoproteinele de înveliş mediază ataşarea virionilor de celulele sensibile.

Hemaglutinina este o glicoproteină cu *orientare membranară de tip II*. Capătul $-NH_2$ este ancorat în citoplasma celulei, iar capătul C-terminal se extinde în spaţiul extracelular. Are o mare afinitate pentru acidul *sialic* din glicoproteinele membranei celulare, care au rol de receptor. Ataşarea virionilor pe eritrocite se face cu afinitate suficient de mare pentru a produce *hemaglutinarea*. Aceiaşi proteină poate avea şi activitate *neuraminidazică* şi de aceea se numeşte *hemaglutinin-neuraminidază (HN)*.

Proteina de fuziune (F) are rolul de a media fuziunea învelişului lipoproteic viral, cu suprafaţa lipoproteică a membranei celulare în procesul infecţiei. Se găseşte pe suprafaţa virionilor tuturor reprezentanţilor familiei. Se sintetizează ca o proteină precursoare inactivă de 540–580 aminoacizi (F_o), dar ulterior este clivată în două subunităţi – F_1 (mai mare) şi F_2 – ce rămân legate prin punţi S-S. Pentru ca învelişul viral să fuzioneze cu membrana citoplasmatică, este necesară cooperarea HN şi a proteinei F. După ce interacţionează cu receptorul celular, proteina H îşi schimbă configuraţia şi expune peptidul F. Concomitent cu fuziunea, nucleocapsida virală este eliberată în citoplasmă. Nucleocapsida paramixovirusurilor nu se dezasamblează natural: genomul este transcris şi replicat în interiorul nucleocapsidei. ARN împachetat strâns, datorită flexibilităţii capsomerelor, rămâne accesibil polimerazelor virionului, care transcriu catena de polaritate negativă în mesagerii complementari, înainte de dezagregarea capsidei.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

Suprafața internă a învelișului este tapetată cu o proteină neglicozilată, *proteina M* (matriceală), cu rol în recunoașterea specifică între proteina N a nucleocapsidei și glicoproteinele de înveliș, în procesul asamblării.

ARN genomic este complexat cu 3 proteine:

– proteina *N* (*n*ucleoproteina);

– polimeraza *P* (o *p*hosfoproteină);

– polimeraza *L* (*L*arge).

ARN și proteina N (2600 molecule) formează nucleocapsida helicală, rezistentă la nuclează. Proporția proteinelor L/P este de 30/300.

Acțiunea celor 2 polimeraze este *sinergică*, deoarece purificate, nici una nu catalizează transcrierea. Polimerazele au și rolul de a *prelucra* ARNm după transcriere, adăugând poli-A la capătul 3' și metil 7-G la capătul 5'.

Genomul are o lungime de 15–16 kb și conține un set de 6 sau mai multe gene*, legate covalent în tandem. Genomul conține secvențe scurte (<100 nt) netraduse la capetele 3' și 5', denumite 'leader și trailer', cu elemente promotoare pentru replicare și transcriere. Ordinea genelor 3'–5': N, P/V/C, M, F, H/HN, L.

* Termenul de genă se referă la secvența de ARN genomic care este transcris într-o singură moleculă de ARNm, dar prin schimbarea cadrului de citire și datorită evenimentelor de ARN editing, genele P, M, F codifică și alte tipuri de molecule.

Gena N codifică nucleoproteina (proteina majoră a virionului). Fiecare moleculă N se asociază cu 6 nucleotide; circa 13 molecule N formează un tur de spiră a helixului. Cea de a II-a genă (P), la *Morbillivirus*, codifică 3 proteine cu rol în transcriere și în controlul imunității înnăscute : P, V, C.

Genele 3,4,5 codifică proteinele de înveliș: M, H/HN, F, iar gena 6 codifică proteina L (ARN-pol). Proteina M este localizată sub stratul lipidic, nefiind o proteină membranară și are rol în asamblarea vironilor.

Proteina F, un trimer, este activată prin clivare de furină, o protează ubicvitară în celule și mediază fuziunea peplosului viral cu membrana celulei. Fuziunea este necesară atât pentru pătrunderea virusului în celulă, cât și pentru diseminarea prin fuziune, care duc la formarea sincițiilor. Activitatea fuzionantă a proteinei F este dependentă de proteina H/HN, ce recunoaște un receptor membranar.

Genomul este nesegmentat și permite o variație genetică și antigenică limitată, mult mai restrânsă decât a virusurilor influenza. Nu se face reasortare genomică, iar variabilitatea este restrânsă la *modificările mutaționale*.

Cei mai mulți virioni ai unui preparat conțin o catenă de *ARN de polaritate negativă*, dar în capsidă pot fi incluse și catene de *polaritate pozitivă*. De aceea, în timpul izolării ARN se pot produce asocieri de catene. Preparatele virale obținute prin infecția substratului celular cu o doză mare de inocul, conțin o proporție mare de *virioni defectivi*, fără genom. Defectivitatea se datorează unor erori de replicare a ARN genomic.

Ciclul de multiplicare la mononegavirale (Paramyxo-, Rhabdo-, Filoviridae)

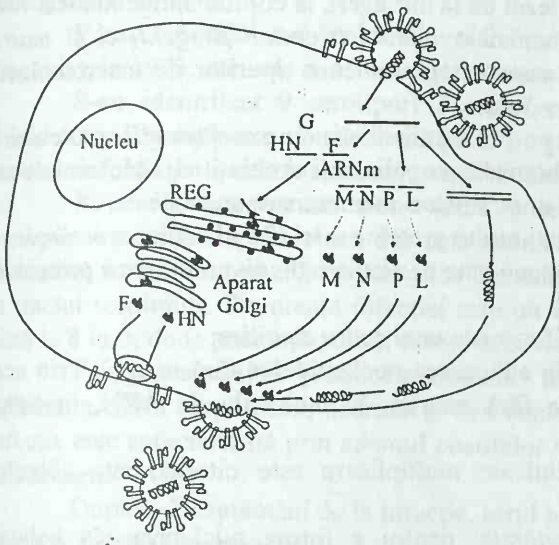
Proteinele învelișului (HN, H sau G) mediază atașarea virionilor de membrana celulei sensibile, la nivelul *glicoproteinelor* sau *glicolipidelor* care conțin *acid sialic*. HN fixează virionul pe receptor, dar are și activitate NA, adică clivează resturile de acid sialic ale receptorilor. Cele 2 activități sunt co-localizate într-un singur situs, cu 2 stări conformaționale distincte.

Nucleocapsida cu proteinele auxiliare (enzimele de transcriere) este eliberată în citoplasmă prin procesul fuziunii mediat de proteina F a învelișului viral, cu membrana celulei. Toate stadiile multiplicării virale se desfășoară în citoplasmă.

Catena de ARN genomic are polaritate *negativă*. Virionul conține polimerazele funcționale *L* (*L*arge) și *P*, ce catalizează transcrierea și replicarea ARN genomic: proteinele L (*Large*) și P (*Phosphoprotein*), cu funcție polimerazică (fig. 395).

ARN-polimerazele virale dependente de ARN inițiază transcrierea mesagerilor la capătul 3' al moleculei genomice, în citoplasmă, fără să necesite primeri exogeni. Complexul de transcriere

bonetează capătul 5', metilează şi poliadenilează capătul 3' al moleculelor de *ARNm.* Mesagerii sunt *monocistronici,* fiecare genă fiind transcrisă într-o moleculă distinctă de ARNm.



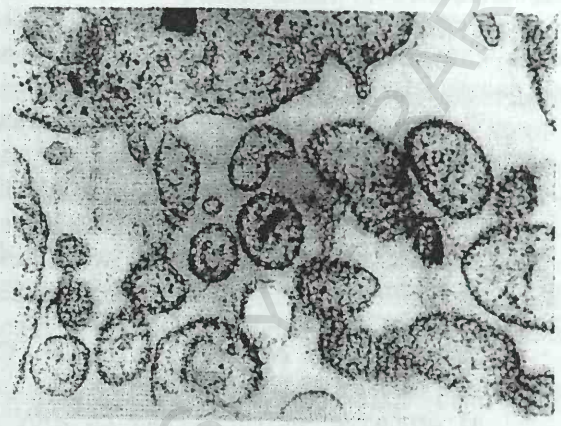


Fig. 395. În stânga, reprezentarea schematică a *ciclului de multiplicare a virusului rujeolic.* Proteina F se asociază cu microdomenii membranare (pontoane lipidice) şi atrage proteinele H la situsurile la care virusul va înmuguri. Genomul ARN nascent se asociază cu proteina N şi formează nucleocapsida. Proteinele P şi L se asociază cu nucleocapsida în aria perinucleară. Proteina M se asociază atât cu nucleocapsida în citoplasmă, cât şi cu glicoproteinele virale rezidente în membrana citoplasmatică. Nucleocapsidele progene se agregă în zonele modificate ale membranei şi înmuguresc. În dreapta, *imagine electrono-optică a virionilor rujeolei.* La locul agregării proteinei M, membrana devine electrono-densă şi uşor deformabilă. Nucleocapsida înmugureşte într-o structură veziculară – virionul. Virionii au dimensiuni diferite, ceea ce reflectă absenţa controlului riguros al morfogenezei. În membrana celulelor infectate se inseră o cantitate mare de glicoproteine virale, ceea ce le conferă capacitatea de aderenţă de celulele adiacente, iar proteina F favorizează fuziunea şi formarea celulelor gigante multinucleate, x 120.000, original.

Forma de replicare dublu catenară, funcţionează alternativ cu rol de matriţă, atât pentru *transcrierea ARNm* cât şi pentru *sinteza replicativă a ARN.* Ambele activităţi sunt catalizate de ARN-polimerazele virale. Enzimele recunosc acelaşi promotor la capătul 3' al genomului complexat cu nucleoproteina şi progresează spre capătul 5'.

Diferenţa dintre transcriere şi replicare este determinată de modul în care polimerazele progresează pe matriţa ribonucleoproteică: *secvenţial* sau *continuu.*

Pentru *transcriere, ARN-polimeraza* recunoaşte *semnalele scurte de start şi de stop,* care delimitează cistronii. Transcrierea *se opreşte şi procesul se reiniţiază* la fiecare joncţiune genică.

După fiecare semnal stop, transcrierea este reluată cu o rată mai scăzută, de la semnalul *start* al cistronului următor. De aceea, rata transcrierii ARNm dintr-un cistron este proporţională cu poziţia sa faţă de capătul 3' al genomului, scăzând progresiv faţă de punctul de iniţiere. Transcrierea este independentă de funcţiile nucleului şi progresează chiar în prezenţa *actinomicinei D* (inhibitor al transcrierii ADN-ARN) şi a inhibitorilor sintezei proteice. Se sintetizează ARNm pentru proteinele N, P, G, M, L.

Replicarea ARN semnifică sinteza unor molecule întregi. Activitatea de *replicază* a polimerazei progresează *continuu,* pe forma de replicare dublu catenară, folosind ca matriţă catena anti-genomică cu polaritate pozitivă. Se sintetizează catene genomice, cu polaritate negativă.

Catenele genomică şi antigenomică funcţionează ca matriţe după ce se complexează cu nucleoproteina, pentru a fi protejate de acţiunea nucleazei. De aceea, sinteza nucleoproteinei este necesară, atât pentru transcriere, cât şi pentru replicare.

Comutarea de la transcriere la replicare este condiţionată de cantitatea de *nucleoproteină. Nivelul scăzut al nucleoproteinei orientează activitatea ARN-polimerazei în sensul transcrierii ARNm.*

Creşterea cantităţii de nucleoproteină, ca rezultat al traducerii mesagerilor săi, induce inactivarea semnalelor de stop şi start şi astfel comută sinteza ARN de la transcrierea discontinuă a mesagerilor, la *copierea continuă a matriţei* şi sinteza copiilor antigenomice. În esenţă,

ARN-polimeraza nu mai recunoaşte semnalele cistronice de start şi stop. Se sintetizează de 6 ori mai multe catene genomice decît catene de polaritate pozitivă. Astfel, disponibilitatea proteinei N pare să constituie principalul factor reglator al comutării sintezei de la mesageri, la copiile antigenomice.

Replicarea ARN genomic furnizează nu numai *genomul virionilor progeni*, ci şi *matriţe multiple pentru transcriere*, ceea ce determină o creştere logaritmică a tipurilor de macromolecule specific virale.

Proteinele virale se sintetizează în citosol, pe polisomii liberi, cu excepţia glicoproteinei de înveliş, care se sintetizează ca o proteină transmembranară, pe polisomii asociaţi reg. Moleculele sale sunt transferate pe calea cisternelor Golgi, la nivelul unor situsuri membranare speciale.

Toate paramixovirusurile codifică una sau mai multe proteine mici (20 kDa), *nestructurale*.

Membrii subfamiliei *Paramyxovirinae* au mecanisme particulare de diversificare a proteinelor codificate, fără să mărească dimensiunile genomului:

– *ribosomii iniţiază traducerea* la situsuri diferite ale unui cadru de citire;

– *prin ARN "editing"*, proces care constă în adăugarea nucleotidelor fără matriţă. Prin acest mecanism, bazele (în special G) sunt încorporate fără matriţă, în molecula de ARN, în timpul transcrierii, diversificând copiile şi produsele lor.

Asamblarea şi eliberarea virionilor. Ciclul de multiplicare este citoplasmatic. Nucleocapsidele se asamblează în două etape:

a) *asocierea nucleoproteinei cu ARN genomic*, pentru a forma nucleocapsida helicală, rezistentă la nuclează, la care se adaugă ulterior proteinele P şi L şi rezultă ribonucleoproteina. Componenta majoră a nucleocapsidei – *proteina N* – are rol esenţial în procesul asamblării virionului, deoarece interacţionează cu proteina M şi se asociază cu polimerazele;

b) *asamblarea învelişului viral se face la suprafaţa celulei*. Situsurile membranare la nivelul cărora are loc înmugurirea se modifică în ceea ce priveşte conţinutul glicoproteinelor. Proteinele virale de înveliş, glicozilate la nivelul cisternelor reticulului endoplasmic şi a aparatului Golgi înlocuiesc glicoproteinele celulare inserate în stratul lipidic al membranei plasmatice. *In vivo*, glicoproteinele virale sunt orientate spre suprafaţa apicală a celulelor endoteliale, dar pentru alte virusuri învelite, glicoproteinele sunt orientate spre suprafaţa bazală. Ulterior, proteina M se agregă pe faţa internă a învelişului nascent, prin interacţiuni necovalente. Nucleocapsida recunoaşte proteina M şi la nivelul acestor situsuri are loc înmugurirea din membrana citoplasmatică.

NA, a cărei activitate rezidă în spiculele HN are acelaşi rol ca şi NA de la virusul influenza – de a desializa glicoproteinele virale – pentru prevenirea agregării virionilor.

ECP. Pe măsura progresiei ciclului de multiplicare, membrana celulei se încarcă cu spiculi glicoproteici. Dacă în mediu se găsesc enzime de tipul tripsinei, moleculele F_o se activează şi mediază *fuziunea* cu celulele învecinate. Este fenomenul *fuziunii din interior*, care permite diseminarea infecţiei de la o celulă la alta, evitând contactul cu anticorpii. *In vitro*, infecţia cu o doză mare de virus produce fuziunea înainte de multiplicarea virală (*fuziunea din exterior*). Fuziunile intercelulare pot să implice un număr mare de celule şi se formează sinciţii, atât *in vitro*, cât şi *in vivo*.

În sinciţii multiplicarea continuă, se eliberează virus progen şi celulele se lizează.

Celulele mezenchimale, în general, sunt *rezistente* la liză. S-au raportat numeroase cazuri de infecţii persistente, *in vitro*, ale celulelor mezenchimale (Şorodoc şi Mihăescu, 1980).

Multiplicarea virusului rujeolic nu inhibă metabolismul celulei, dar liza, uneori rapidă, survine datorită formării sinciţiilor prin fuziune.

Modificările citogenetice includ ruperi cromosomale multiple, o adevărată pulverizare, în special în sinciţii, datorită condensării premature a cromatinei în nucleii sinciţiilor.

Epidemiologie. Infecţiile se transmit pe cale respiratorie, prin intermediul aerosolilor contaminaţi. Nu există vectori. Nu infectează plantele.

g. ***Paramyxovirus*** infectează omul şi alte specii de mamifere şi păsări.

S-au identificat 5 tipuri antigenice (serologice) de *Paramyxovirus*, infecţioase pentru om, maimuţă, câine, oaie, şoarece), denumite *Parainfluenza 1, 2, 3, 4A* şi *4B*. *Parainfluenza 2* infectează şoarecele (*virus Sendai*). In clasificarea nouă, virusurile *Parainfluenza* 1 şi 3 au fost incluse în g. *Respirovirus*, iar *Parainfluenza* 2 şi 4, în g. *Rubulavirus*, ca şi virusul oreionului. Cele două

genuri, împreună cu *Morbilivirus* fac parte din subfamilia *Paramyxovirinae*, iar subfamilia *Pneumovirinae* include g. *Pneumovirus* cu virusul respirator sincițial (VRS) și g. *Metapneumovirus*, recent izolat de la om.

Virusul Sendai s-a izolat din plămânul unui nou născut cu pneumonie fatală în Sendai (Japonia), în 1953, dar este considerat virus murin.

S-au identificat 9 serotipuri *Parainfluenza*, infecțioase pentru păsări (1–9) incluse în g. *Avulavirus*. *Parainfluenza* 1 infectează puiul de găină și se numește *virusul bolii Newcastle* (NDV), ce produce infecții de la cele inaparente, până la cele viscerale letale.

Virusul parainfluenza uman (HPIV) se transmite prin inhalarea aerosolilor eliberați din secrețiile tractului respirator sau din cele nazale. Perioada de incubație este de 2–8 zile. Virusul se multiplică în epiteliul nazofaringian și se disemnează în arborele traheobronșic. Se multiplică numai în tractul respirator. Recurența infecției este un fenomen comun. HPIV se poate izola o perioadă de până la 8 luni, de la pacienții izolați complet, ceea ce sugerează eliberare prelungită.

Patogeneza. HPIV produce pneumonie și bronșiolită, mai ales la copiii de până la doi ani, cu inflamația căilor respiratorii, necroză și descuamarea epiteliului, edem, sinteza în exces a mucusului. Infecția este caracterizată prin edemul coardelor vocale, al laringelui, traheii, bronhiilor, cu obturarea căii aeriene.

După 1–2 săptămâni de la infecție, serul pacienților conține Ac anti-HN, N, P, F și anti-M. HN pare a fi cea mai imunogenă.

HPIV se izolează din secrețiile tractului respirator. Secrețiile sau tamponul faringian se resuspendă în 2 ml mediu de creștere cu 10% ser fetal de vițel, în care infecțiozitatea virusului se păstrează. Suspensia se centrifughează la 2000 g (10 min.) pentru depunerea bacteriilor contaminante și a celulelor descuamate. Supernatantul se inoculează pe cultură de fibroblaste umane sau pe culturi primare de rinichi de maimuță. Multiplicarea virusului în cultură se identifică prin capacitatea sa de a induce fenomenul de *hemadsorbție*. După îndepărtarea mediului nutritiv, monostratul de celule se acoperă cu suspensie eritrocitară de cobai sau de cocoș. Hemadsorbția se observă la microscopul optic.

g. ***Pneumovirus*** (*pneuma*, lb. greacă = respirație) cuprinde *virusul respirator sincițial* (VRS) uman și bovin, *virusul pneumoniei* șoarecelui, *virusul rinotracheitei* la curci. S-au identificat două grupe antigenice: A și B.

VRS de grup A are 15 122 nucleotide și codifică 11 proteine din mesageri monocistronici, cu excepția ARN M_2, care codifică proteinele $M_{2\text{-}1}$ și $M_{2\text{-}2}$. In structura virionului se găsesc 8 proteine (L, G, F, N, P, M, $M_{2\text{-}1}$ și SH), alte două sunt nestructurale (NS_1 și NS_2), iar $M_{2\text{-}2}$ are rol reglator. In structura capsidei intră 3 proteine (N, P, L), două sunt componente ale matricei (M și $M_{2\text{-}1}$, neglicozilate), iar alte 3 sunt inclavate în peplos (F, G glicozilate și proteina SH neglicozilată). Proteina F mediază fuziunea peplosului viral cu membrana celulei sensibile, iar proteinele G și SH stimulează procesul fuziunii.

VRS a fost izolat de la cimpanzeu. Este ubicvitar, fiind agentul patogen major al infecției respiratorii acute la copiii mici (sub un an), unde produce cel mai tipic tablou patologic al paramixovirusurilor.

Epidemiologie. VRS este foarte infecțios. Epidemiile apar anual în regiunile temperate, în sezonul rece. La copiii mai mici de 3 ani, infecția primară se extinde în tractul respirator inferior și este cea mai severă în primele 6 luni de viață. Toți copiii se infectează în primii 3 ani de viață. La copiii imunodeficitari, infecțiile sunt grave și implică plămânul. Reinfecțiile apar în tot cursul vieții.

Perioada de incubație este de 3–6 zile, cu variații între 2–8 zile. Virusul pătrunde prin tractul respirator superior, se multiplică și infecția progresează descendent și produce bronșiolită /pneumonie, deoarece virusul maturat prin înmugurire este înglobat prin fuziune cu membrana celulei învecinate.

Patologie. Tabloul clinic caracteristic al infecției cu VRS la copilul mic este *bronșiolita*, care constă în inflamația peribronhiolară cu leucocite, iar mucoasa și adventicea sunt edematoase. Leziunile progresează la necroză, cu desprinderea epiteliului alveolar, ce poate fi asociat cu răspunsul proliferativ al epiteliului. Obturarea bronhiolelor cu celulele epiteliale descuamate și cu exudatul inflamator duce la obturarea parțială a tranzitului aerului, semnul clinic distinct al

bronşiolitei. Lumenul îngust al căilor aeriene ale copilului este predispus la obstrucţie* şi la secreţia crescută de mucus.

* Dacă lumenul bronhiolelor este incomplet obturat, aerul se opreşte distal (în aval) faţă de locul ocluziei parţiale. Asemenea unui mecanism al balonului cu valvă, trecerea aerului este mai uşoară în timpul inspiraţiei (datorită presiunii negative), dar în expiraţie, la creşterea presiunii pulmonare, lumenul căii se îngustează, producând obstrucţia mai accentuată sau completă a căii aeriene. Aerul blocat produce creşterea volumului pulmonar, caracteristică bronşiolitei, asociată cu hipoxia de diferite grade. Resorbţia manifestărilor patologice poate avea loc în câteva săptămâni. Epiteliul bronhiilor începe să se regenereze în 3–4 zile, dar celulele ciliate ale bronhiilor se refac în mai mult de 2 săptămâni. Schimbările patologice ale bronşiolitei progresează sau coexistă cu acelea ale pneumoniei, când ţesutul interstiţial se infiltrează cu mononucleare care colapsează alveolele şi accentuează hipoxia.

Răspunsul imun înnăscut se caracterizează prin sinteza chemokinelor şi citokinelor proinflamatorii. Chemokinele sunt atractante pentru neutrofile, eozinofile şi NK ce produc IFNγ. Infecţia primară induce sinteza IgM, apoi a IgG, în a II-a săptămână de la infecţie. Titrul Ac scade după 1–2 luni. Anticorpii sunt specifici anti-F şi anti-G, ambele glicozilate (în special G) şi din această cauză, slab imunogene pentru copii.

RIMC este esenţial pentru evoluţia infecţiei. Copiii şi adulţii cu deficit al IMC fac infecţii severe cu VRS, indiferent de intensitatea RIMH. Răspunsul imun faţă de Ag VRS variază în funcţie de calea de activare: Th_1 sau Th_2. Răspunsul imun dominat de celulele Th_1 este asociat cu controlul infecţiei şi sterilizarea focarului, fiind caracterizat prin stimularea TCD_4 ce secretă IFN şi a limfocitelor TCD_8 ce secretă IL-2, IFNγ şi IFNα. Răspunsul dominat de Th_2 este caracterizat prin activarea celulelor TCD_4 care eliberează IL-4, 5 şi IL-13, infiltrarea plămânului cu eozinofile şi sinteza IgE, iar clinic, prin hiperreactivitatea căilor respiratorii şi infecţie severă. Raportul dintre cele două subpopulaţii de CD_4 este influenţat de vârstă, de factorii genetici, de modul de prezentare a Ag virale.

Boala Croup semnifică inflamarea coardelor vocale, cu obturarea respiraţiei, ceea ce impune traheotomia.

La adult, infecţia produce o răceală comună. Multe infecţii sunt asimptomatice, dar se pot exacerba la cei cu bronşită cronică şi la fumători. Infecţiile sunt limitate la poarta de intrare (epiteliul căilor aeriene superioare).

Diagnosticul infecţiei se face prin izolarea virusului, sau diagnosticul rapid prin tehnici moleculare. Virusul se izolează pe celulele HEp-2, unde ECP apare în 3–5 zile. Alte teste pentru detectarea Ag virale au avantajul rapidităţii: EIA (enzyme immunosorbent assays); PCR este cea mai sensibilă şi specifică.

Pentru tratamentul bronşiolitei se administrează bronhodilatatoare, glucocorticoizi şi antibiotice. La adulţi se administrează ribavirina (un nucleozid sintetic ce interferă cu traducerea ARNm), sub forma aerosolilor, dar beneficiul este incert.

Nu există un *vaccin* eficient cu VRS. S-au obţinut mutante atenuate prin adaptare la rece (cold passage) şi prin mutageneză chimică pentru obţinerea mutantelor *ts*, ce se multiplică la 32–35° în tractul superior, dar nu la temperatura mai mare din tractul inferior. Mutantele tind să fie instabile genetic.

g. ***Rubulavirus*** produce oreionul. Virusul infectează glandele parotide, dar curând apare viremia şi infecţia devine sistemică cu diseminare viscerală. Complicaţiile care pot să survină sunt meningoencefalita, orhita, pancreatita, ooforita (infecţia ovarului), artrita, miocardita şi disfuncţia renală. Orhita la adult produce sterilitate, iar pancreatita poate să predispună la diabet insulino-dependent.

Virusul se poate izola din salivă, urină, LCR.

In vitro produce sinciţii gigante (fuziune).

Vaccinul oreionului este foarte eficient. Se folosesc tulpini atenuate, care protejează în proporţie de 95% pe cei vaccinaţi.

g. ***Morbillivirus*** (*morbili*, lb. latină, este pluralul de la *morbilus*, diminutiv de la *morbus* = boală) cuprinde virusul rujeolei, virusul jigodiei (distemper) canine (virusul bolii Carré), virusul pestei bovinelor (rinderpest) înrudite genetic şi antigenic.

Raporturile strânse sunt reflectate de faptul că virusul rujeolei, inactivat, imunizează câinele față de virusul bolii Carré. Virusul rujeolei produce *infecții cu exantem* (rash), adică *erupție veziculară eritematoasă*, cu complicații rare la nivelul SNC și aparatului respirator.

Caracteristicile definitorii ale g. *Morbillivirus* sunt absența activității NA și legarea de receptorul SLAM (o moleculă semnal a activării limfocitelor).

Gena P codifică 3 proteine: P, V, C. Proteina P este componenta esențială a ARN-pol. Proteina V are rolul de a contracara RI înnăscut, pentru că interferă cu calea de semnalizare intracelulară ce declanșează răspunsul celulei la IFN și astfel favorizează diseminarea virusului în SI al gazdei. Proteina C inhibă răspunsul celulei la IFN și este, ca și proteina V, un factor de virulență.

Morbillivirus nu utilizează acidul sialic și proteina H nu are activitate NA. Receptorul celular este SLAM, a cărei expresie este limitată la celulele SI (este constitutivă pe timocitele imature, pe celulele T de memorie, pe unele celule B). Monocitele și CD exprimă SLAM numai după activare (Cattaneo și colab., 2008).

Rujeola este o maladie foarte contagioasă, specifică omului. Virusul nu are rezervor natural. Rujeola este o infecție a copilăriei și pentru ca virusul să se mențină este necesară o populație de câteva sute de mii de indivizi, în care să apară noi susceptibili, pentru că infecția este însoțită de o imunitate protectoare solidă pentru tot restul vieții.

Virusul se transmite prin aerosoli contaminați, eliminați prin vorbire, tuse, strănut. Perioada de incubare este de 7–10 zile. Infecția se inițiază când virusul ajunge pe *celulele epiteliale* ale tractului respirator, în orofaringe sau pe conjunctivă, unde produce o infecție acută. Timp de 2–4 zile, virusul se multiplică local în mucoasa respiratorie, trece în sânge și produce *viremia primară*. Limfocitele îl transportă în organele limfoide secundare (în ganglionii limfatici), unde se desfășoară ciclul de multiplicare *secundară*. De aici trece în sânge și determină *viremia secundară*, mai intensă, în cursul căreia virusul este diseminat sistemic, în celulele *endoteliului vascular* și rezultă o infecție generalizată acută. Virusul se multiplică în *celulele endoteliale* ale vaselor mici.

Infecția celulelor endoteliale este însoțită de dilatarea vaselor, infiltrarea perivasculară a mononuclearelor, creșterea permeabilității vasculare, edem, ceea ce determină erupția tegumentară. Sunt infectate vasele mici ale dermului superficial, capilarele conjunctivei, ale mucoasei orale și faringiene, ale laringelui, traheii, bronhiilor, capilarele alveolare și meningeale, ale tractului intestinal, vasele mici din splină, timus, ganglionii limfatici, formațiunile limfoide asociate mucoaselor.

Răspunsul imun. Răspunsul imun primar este caracterizat prin sinteza IgM și activarea IMC (celulele CD_4 de tip 1 și CD_8). Rolul limfocitelor T în eliminarea infecției cu virus rujeolic este esențial. La copiii cu reactivitate imunitară normală, infecția produce erupția caracteristică.

La copiii cu deficit funcțional al celulelor T, infecția este adeseori fatală. Erupția veziculară eritematoasă (rash) este mediată de celulele T și la copiii imunodeficitari sau imunosupresați nu se produce. Erupția tegumentară este indicatorul evoluției favorabile a infecției.

La copiii hipo- sau agamaglobulinemici, erupția se produce și evoluția infecției este nealterată de absența Ac. Se instalează IMC de memorie, iar anticorpii nu sunt esențiali pentru controlul infecței primare și nici pentru răspunsul secundar (de memorie).

Patologie și histopatologie

Infecția rujeolică determină mortalitatea a circa 20% dintre copiii subnutriți, cu vârsta sub 5 ani. Cauza morții este, de obicei, infecția bacteriană pulmonară secundară datorată *imunosupresiei* consecutive infecției rujeolice. Imunosupresia durează câteva luni și constă în diminuarea funcției celulelor T și B, scăderea imunității celulare, asociată cu creșterea sensibilității la tuberculoză. Imunosupresia este consecința faptului că virusul rujeolei infectează celulele dendritice, dar nu se cunoaște mecanismul scăderii reactivității celulelor T.

Virusul infectează celule de origine ectodermică, endodermică și mezodermică. Semnul histopatologic distinct al infecției cu virusul rujeolei este formarea *sinciților*, celule gigante multinucleate mediate de proteina F, ce se observă pe secțiunile histologice în organele limfoide, în plămân, în epiteliul columnar al traheii, în epiteliul squamos stratificat al tegumentului și mucoasei bucale, în epiteliul de tranziție al vezicii urinare și uretrei și chiar în endoteliul arterelor pulmonare mici. Sincițiile generate de limfocite, macrofage, CD sau de celulele reticulare, sunt sediul

multiplicării virale şi se lizează pe măsură ce virusul este eliminat de efectorii imunitari. Patologia infecţiei se datorează inflamaţiei şi lizei celulare, urmată de reparare tisulară fără fibroză. Infecţiile bacteriene secundare sau cu alte virusuri sunt comune.

Infecţii persistente. Virusul *rujeolic* produce, de obicei, o infecţie acută şi autolimitată. De cele mai multe ori, după infecţia acută, organismul se sterilizează, iar memoria imunitară se păstrează tot restul vieţii.

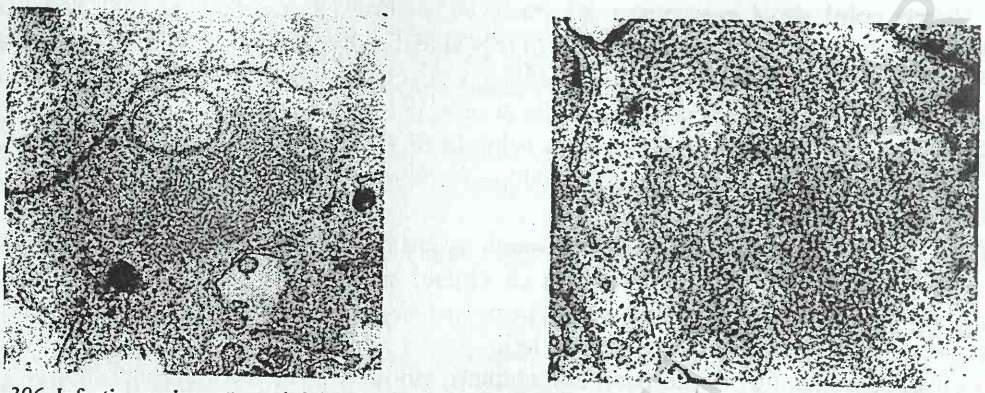


Fig. 396. Infecţia persistentă a celulelor de rinichi de viţel, cu virusul rujeolic. În celulele infectate persistent, asamblarea şi eliberarea virionilor prin înmugurire sunt procese limitate, datorită unui deficit cantitativ al proteinei M. Proteina N se asociază cu molecula de ARN genomic şi formează nucleocapside care se acumulează şi formează incluzii citoplasmatice în aria perinucleară. În stânga, nucleocapsidele filamentoase perinucleare. În dreapta, detaliu al incluziei cu nucleocapside filamentoase, x 47.000, respectiv 135.000 (original).

Imunodeficienţele primare şi secundare ale IMC constituie riscuri majore pentru persistenţa infecţiei în tractul respirator inferior şi în SNC. Deficienţa IMH nu influenţează controlul multiplicării virusului. În ţesutul pulmonar, persistenţa duce la *pneumonia cu celule gigante*.

În faza viremiei secundare, probabil virusul *pătrunde în SNC*, prin infecţia capilarelor meningeale, a membranei piamater sau a plexurilor coroide. Cu o frecvenţă mare, virusul rujeolic determină *infecţii persistente ale neuronilor* asociate cu maladii neurologice: encefalita post-infecţioasă acută cu corpi de incluzie şi rareori, *panencefalita sclerozantă subacută* (*PESS*). PESS este o afecţiune rară a adulţilor tineri, caracterizată prin demielinizare progresivă, lentă a SNC, cu sfârşit letal. O altă complicaţie este encefalomielita acută demielinizantă, asociată cu reacţia autoimună faţă de mielină.

În neuroni şi în celulele gliale infectate s-a detectat un număr mare de nucleocapside, iar titrul anticorpilor în lichidul cefalorahidian este crescut. Genele care codifică sinteza proteinelor de înveliş sunt exprimate puţin sau deloc. Neuronul este o celulă nepermisivă pentru multiplicarea virusului rujeolic. Neuronii infectaţi sintetizează cantităţi mici de proteină M şi nu expun glicoproteinele virale pe suprafaţa lor. Virusul nu înmugureşte. Nu se eliberează virus progen (infecţie persistentă neproductivă). Neuronii infectaţi evită acţiunea celulelor citotoxice prin fenomenul *modulaţiei antigenice**, ce constă în diminuarea cantitativă a antigenelor expuse la suprafaţa celulei în prezenţa anticorpilor specifici.

* Fenomenul modulaţiei antigenice a fost evidenţiat *in vitro*, prin adăugarea anticorpilor specifici faţă de virusul rujeolic, marcaţi cu fluorocromi, în mediul de creştere a celulelor infectate (neuroni şi limfocite). Se produce redistribuirea şi bonetarea glicoproteinelor virale expuse pe suprafaţa celulelor, urmată de eliminarea lor sub forma complexelor cu anticorpii. Celula modulează cantitatea antigenelor expuse la suprafaţă, diminuând cantitatea lor şi devine rezistentă la acţiunea efectorilor imunitari. Modularea antigenică indusă de anticorpi are o semnificaţie biologică mai largă, în sensul că reprezintă un mecanism prin care celulele purtătoare de antigene (virale sau tumorale) pot să-şi reducă semnificativ cantitatea de molecule nonself exprimate pe suprafaţă, evitând astfel acţiunea mecanismelor de supraveghere imunitară.

Semnele clinice ale PESS apar la circa 7 ani după infecţia rujeolică. Disfuncţiile SNC se intensifică treptat: apar tulburări psihice, de comportament, deteriorarea progresivă a funcţiilor intelectuale, paralizia. Moartea survine la 6 luni–3 ani de la declanşare.

Profilaxia. Pentru controlul infecţiilor cu virusul rujeolei şi al oreionului se produc vaccinuri *atenuate*. Cele două vaccinuri se administrează asociat, pe cale orală şi induc sinteza sIgA protectoare. Administrarea parenterală nu este protectoare.

Virusurile *Parainfluenza* 1–4 şi VRS nu sunt controlate prin vaccinare, pentru că proteinele lor de suprafaţă sunt slab imunogene. Formolul inactivează imunogenitatea proteinei F şi organismul rămâne neprotejat faţă de diseminarea virusului prin fuziune.

Bibliografie

Lamb R. A., Kolakofsky D. 1996. *Paramyxoviridae* : The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, third Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Kingsbury D. W. *Paramyxoviridae* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Pringle C. R., Heath R. B. 1990. *Paramyxoviridae*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Chanock R. M., McIntosh K. 1990. *Parainfluenza* Viruses, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al, Raven Press, Ltd., New York.

Norrby E., Oxman M. N. 1990. Measles Viruses, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al, Raven Press, Ltd., New York.

Malvoisin E., Fabian Wild T. 1993. Measles Virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins – Journal of General Virology, 74, 2365–2372.

Henrickson K. J. 2003. *Parainfluenza* Viruses – Clin. Microbiol. Rev. 16, 242–264.

Vainionpaa R., Hyypia T. 1994. Biology of *Parainfluenza* Viruses – Clin. Microbiol. Reviews 7, 2, pp. 265–275.

Psarras S., Papadopoulos N. G., Johnson S. L. 2004. *Parainfluenza* Viruses, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Breese Hall Caroline 2004. Respiratory Syncytial Virus, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Breese Hall Caroline. 2009. Respiratory Syncytial Virus, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, sixth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, Barry D. Schoub, Paul D. Griffith, Philip Mortimer, Wiley Blackwell, Johhn Wiley & Sons, Ltd.

Şorodoc Y., Mihăescu Gr., Cernescu C., Cajal N. 1980. Persistent measles virus infection in a calf kidney cell line. Electron microscopic observations in the K_2 cell line – Rev. Roum. Med. (Virol.) 31, 2, 125–130.

Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications John Wiley & Sons, Ltd.

Cattaneo R., McChesney M. 2008. *Morbillivirus*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.3. Familia *Rhabdoviridae*

Caracteristica definitorie a virionilor este forma alungită, de glonţ (*rhabdos*, grec = baston). Lungimea este variată, între 100 şi 430 nm, iar diametrul în secţiune, între 50–100 nm, cu excepţia unor virusuri ale plantelor, cu aspect baciliform. In preparatele virale, apar frecvent *virioni defectivi*, cu acelaşi diametru, dar lungimea este de numai 25–50% din cea normală. Compoziţia chimică a particulelor defective este aceiaşi, dar nu sunt infecţioase, deoarece genomul lor este cu 50–80% mai mic decât cel normal.

Reprezentanţii familiei *Rhabdoviridae* au cea mai largă răspândire în natură. S-au identificat peste 100 de variante virale, care infectează vertebratele (mamifere, reptile, peşti), crustaceele, plantele. Virusurile de importanţă clinică (agentul rabiei) şi economică (produc pierderi importante în piscicultură), infectează numai vertebratele. In general, rhabdovirusurile au un spectru larg de gazdă, unele fiind infecţioase atât pentru plante, cât şi pentru artropodele care le transmit. S-au identificat peste 70 de rhabdovirusuri infecţioase pentru vertebrate. Numărul celor infecţioase pentru plante pare a fi de ordinul sutelor, dar puţine dintre ele au fost identificate.

Cel mai adesea, rhabdovirusurile sunt transmise de *artropode*. Artropodele constituie rezervorul originar, din care s-au adaptat virusurile infecţioase pentru plante şi pentru vertebrate. Unele au cicluri mixte (artropod-plantă sau artropod-mamifer), ceea ce argumentează că la origine, aceste virusuri au fost infecţioase pentru artropode.

Rhabdovirusurile infecţioase pentru om şi alte mamifere au fost clasificate în două genuri: g. *Vesiculovirus*, cu reprezentantul tipic al familiei – virusul stomatitei veziculare (VSV) şi g. *Lyssavirus* (*lysa*, lb. greacă = furie), care include virusul rabic şi pe cele asemănătoare. Prototipul acestei familii este VSV, iar virusul rabic prezintă caractere structurale şi funcţionale asemănătoare.

MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura (fig. 397). Virionul este alcătuit din două componente structurale majore: a) *nucleocapsida* ribonucleoproteică, formată prin asocierea intimă a *ARN genomic* cu *proteina* N, cu *fosfoproteina* (*P*) şi cu *ARN-polimeraza* (L). Ribonucleoproteina este împachetată în 35 de spire în virionul infecţios; proteina M tapetează faţa internă a peplosului; b) *învelişul*, reprezentat de un dublu strat lipoproteic, care acoperă nucleocapsida. Pe suprafaţa virionului proemină *spiculele glicoproteice* (G), de 8–10 nm, acilate cu acid palmitic. Fiecare spicul este un trimer al moleculei G, cu o protuberanţă terminală.

Componentele chimice ale virusului rabic sunt ARN (3–4%), proteine (67%, cu 3% glucide) şi lipide (26%). Lipidele derivă în totalitate din membrana celulară, dar sunt selectate în alte proporţii decât cele din membrana plasmatică. Diferenţa principală constă în proporţia mai mare de *colesterol*. Raportul cantitativ modificat al diferitelor categorii de lipide, conferă vâscozitate semnificativ crescută peplosului virionilor, comparativ cu a membranei celulare.

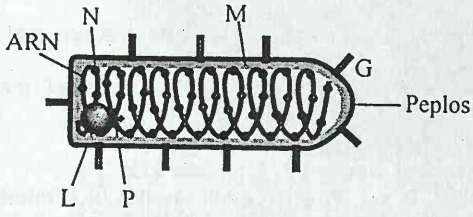


Fig. 397. Structura virionului rabic.

Virusul rabic are aceleaşi 5 proteine majore: N, P, L, M, G. Cea mai abundentă este *proteina N* asociată ARN genomic şi în celulele infectate formează incluziile Babeş-Negri. Proteina N, fosforilată, este formată din 450 aminoacizi, cea mai bine conservată la toate tulpinile de *Lyssavirus*. Moleculele sale se sintetizează în exces, se agregă în cursul sintezei sau se asociază cu proteina P într-o matrice filamentoasă şi formează *incluziile Babeş-Negri*.

Proteina P(fosfoproteina) pare să aibă funcţii multiple: se asociază cu proteina N, împiedicând polimerizarea ei; formează un complex cu proteina L, având rol în transcrierea şi în replicarea genomului; se asociază cu *dineina* (componentă a microtubulilor) şi are rol în transportul intracelular al nucleoproteinei virale. *Proteina L* (2142 aminoacizi, cea mai mare proteină a virionului) este *polimeraza* asociată genomului, cu rol de enzimă de transcriere, bonetare, metilare şi poliadenilare a ARNm.

Proteina M acoperă complexul ribonucleoproteic, iar *proteina G* formează spiculele proeminente ale învelişului, având rol de mediator al fuziunii peplosului cu membrana endosomului, favorizează trecerea virusului dintr-o celulă în alta, are rol în transportul axonal şi în tranzitul sinaptic. Anticorpii anti-G neutralizează infecţiozitatea virionilor. *Glicoproteina* G are activitate hemaglutinantă în condiţii foarte stricte de pH, concentraţie a sărurilor, temperatură. Eritrocitele de gâscă sunt substratul optim pentru hemaglutinare.

Genomul rhabdovirusurilor este o moleculă de ARN monocatenar nesegmentat, cu polaritate negativă, adică este transcris de ARN-polimerază în ARNm. ARN genomic este asociat cu nucleoproteina (proteina N, 422 aminoacizi) şi cu alte două proteine, minore din punct de vedere cantitativ: *P* şi *ARN-polimeraza L*. Genomul şi proteinele asociate constituie RNP, ce formează 35 de spire la virionii infecţioşi.

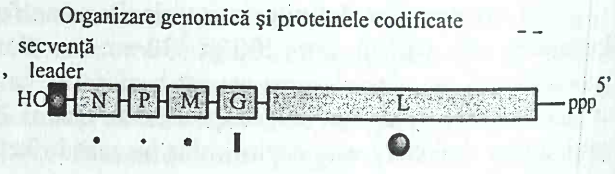


Fig. 398. Organizarea genomică a rhabdovirusurilor.

Genomul ARN conţine 6 gene în ordinea 3'- N-P-M-G (X*)-L- 5' (fig. 398).

* X = genă NS la virusul infecţios pentru peşti, ce produce necroza hematopoetică; codifică o glicoproteină NS a virusului febrei bovinelor; o pseudogenă la virusul rabic.

Rhabdovirusurile au o variabilitate genetică extremă: în ADNc al genei L (6380 nt) de la diferite tulpini de rhabdovirusuri s-au identificat 16 mutaţii punctiforme. Frecvenţa mare a substituţiilor este atribuită infidelităţii ARN-polimerazei virale, dar se pot datora erorilor produse prin reverstranscriere. Mutantele termosensibile (*ts*) şi revertanţii apar cu frecvenţă mare, ceea ce reflectă erorile ARN-polimerazei. Tulpinile de virus rabic izolate din diferite zone geografice sunt distribuite în 4 variante antigenice.

Spectrul de gazdă este foarte larg. Multe rhabdovirusuri infectează insectele şi probabil şi alte artropode, dar nu se ştie în ce măsură transmit infecţia la vertebrate. VSV (virusul stomatitei veziculare) infectează insectele şi vertebratele.

Gradul de diferenţiere a celulelor şi calea de administrare au rol în determinarea sensibilităţii la infecţie. De exemplu, limfocitele în repaus nu sunt infectate, dar devin sensibile după activarea cu substanţe mitogene sau sub acţiunea antigenului specific, iar şoarecele este insensibil după inocularea intraperitoneală, dar este foarte sensibil la un inocul mic, intracerebral.

Citotropismul rhabdovirusurilor depinde, atât de existenţa receptorului celular de suprafaţă, cât şi de condiţiile mediului intracelular pentru multiplicare. Receptorul celular împrumutat de virusul rabic este receptorul pentru *nicotin-acetilcolină**, dar virusul infectează şi celule care nu au un astfel de receptor.

* În funcţie de acţiunea farmacologică a diferiţilor agonişti şi antagonişti s-au distins 2 tipuri de receptori: nicotinici şi muscarinici. Receptorii pentru acetilcolină sunt de tip nicotinic. Din aceiaşi categorie fac parte şi receptorii joncţiunii neuromusculare.

După legarea de receptor, virusul este internalizat în *endosom*. Scăderea valorii pH în endosom, determină fuziunea acestuia cu peplosul viral şi astfel ribonucleoproteina virală este eliberată în citoplasmă. Fuziunea este consecinţa modificării conformaţionale a spiculelor glicoproteice inclavate în peplos.

Ciclul de multiplicare este întru-totul asemănător cu acela al paramixovirusurilor (fig. 399). VSV se fixează pe membrana celulei prin spiculele G şi este internalizat prin mecanismul endocitozei mediată de receptori (EMR). După acidifierea endosomului, glicoproteina G mediază fuziunea peplosului cu membrana endosomului, dezvelirea şi eliberarea nucleocapsidei.

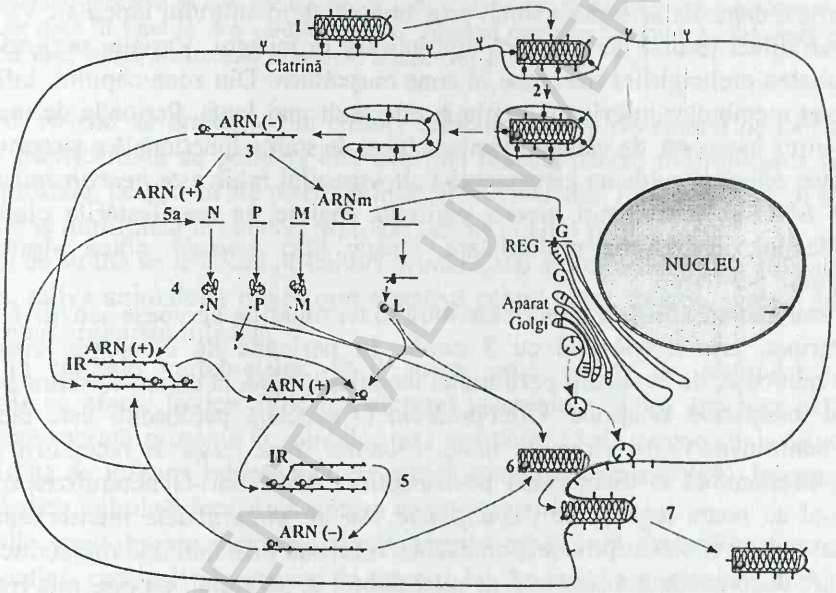


Fig. 399. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a rhabdovirusurilor. 1. Ataşare; 2. Fuziune; 3. Transcriere; 4. Traducere; 5. Replicarea genomului; IR – intermediari de replicare ; 5a. Transcriere secundară; 6. Asamblarea virionilor progeni; 7. Înmugurire.

Genomul VSV este transcris într-un ARN leader de 48 nt şi 5 ARNm monocistronici, traduşi în 5 proteine. Copiile de ARNm sunt mai numeroase pentru capătul 5' şi scad progresiv spre capătul 3', corelate cu raportul cantitativ al proteinelor virale, în ordinea N, P, M, G, L. Mai târziu, ARN genomic este transcris în ARN antigenomic de lungime completă, cu rol în replicare. Proteinele virale se sintetizează în citosol, pe polisomii liberi, cu excepţia glicoproteinei de înveliş, care se sintetizează ca o proteină transmembranară, pe polisomii asociaţi reticulului endoplasmic granular. Moleculele sale sunt transferate pe calea cisternelor Golgi, la nivelul unor situsuri membranare speciale. Una dintre proteinele virale inhibă sinteza ARN şi ADN în celulele infectate.

Asamblarea. Nucleoproteina nascentă instabilă şi fosfoproteina se asociază cu ARN genomic şi îl stabilizează sau se agregă şi formează incluziile. Ulterior se asociază proteina L, formând complexul ribonucleoproteic (RNP). Proteina M se asociază cu RNP şi se produce condensarea

nucleocapsidei, ce formează o spirală strânsă. Alt rol al proteinei M este acela de a lega nucleocapsida de membrană, la locul înmuguririi. Nucleocapsidele migrează spre membrana celulară, la situsurile în care s-au inclavat spiculele glicoproteice. Proteina M interacționează cu domeniul citoplasmatic al proteinei G și inițiază înmugurirea. La capătul aplatizat, membrana nu conține proteina G.

Maturarea se poate face prin înmugurire în reticulul endoplasmic, în special în neuroni. Virusul rabic nu se multiplică în celulele enucleate, spre deosebire de VSV.

Majoritatea rhabdovirusurilor înmuguresc prin *membrana plasmatică*, dar unele se asamblează prin înmugurire la nivelul membranelor celulare interne. Cele care înmuguresc din membranele reticulului endoplasmic (citorhabdovirusuri), sau din membrana nucleară (nucleorhabdovirusuri) se acumulează în spațiul perinuclear

*Gazde sensibile.*Virusul *rabic* infectează mamiferele. Cele mai sensibile sunt vulpea, șacalul, lupul, liliacul. Câinele și pisica au o sensibilitate moderată. Virusul este transmis prin mușcătura animalului infectat.

După inocularea virusului prin mușcătură sau prin injecție experimentală, urmează *faza de eclipsă*. Durata de incubație este variabilă: de la o săptămână până la un an, cu o perioadă medie de 31–90 de zile și se explică prin necesitatea multiplicării în țesutul muscular. La hamsterul inoculat experimental, prin metoda IF și a ME, s-a evidențiat că virusul se multiplică *intramuscular*. Din celulele musculare, virionii se eliberează prin înmugurire și trec în spațiile extracelulare, unde sunt expuși acțiunii anticorpilor (sintetizați după infecție sau administrați sub forma serului imun – imunizare pasivă). Virusul rabic rămâne la sau lângă locul mușcăturii aproape toată perioada de incubație. Faptul s-a demonstrat experimental prin amputarea membrului inoculat. Virusul din inocul poate să invadeze direct țesutul nervos, fără multiplicare în mușchi. Variația perioadei de incubație depinde de densitatea prelungirilor nervoase în zona mușcăturii. Din zona capului, infecția evoluează rapid, iar din zona membrelor inferioare, evoluția este mult mai lentă. Perioada de incubație depinde de cantitatea de virus inoculată, de vârsta organismului și de starea funcțională a sistemului imunitar.

Una dintre cele mai evidente caracteristici ale virusului rabic este *neurotropismul*. Antigenele virale reapar în SNC și în sistemul nervos periferic, înainte de manifestările clinice. După faza musculară a infecției, însoțită de multiplicare, începe *faza neurală*, adică virusul pătrunde în terminațiile nervoase periferice.

Virusul sau nucleocapsidele infecțioase intră în terminațiile nervoase senzitive și motorii și se răspândește centripet, prin *axoplasmă* cu 3 mm/h. In perioada de incubație, virusul se găsește de-lungul căilor nervoase, de la situsul periferic al inoculării, până la creier. Diseminarea este ușurată de trecerea prin joncțiunile sinaptice. *Glicoproteina G* asociată peplosului este factorul major al patogenității și neuroinvazivității virusului rabic. *Proteina G* se leagă de receptorii sinaptici de tip nicotinic pentru *acetilcolină* ai membranei postsinaptice. AMC anti-G neutralizează infecțiozitatea virionilor. Virusul se poate lega și de *fosfolipidele* sau de *glicolipidele* membranare. Transportul virusului prin axon poate fi blocat prin secționarea nervului sau prin inhibiție metabolică cu colchicină aplicată local, care dezorganizează sistemul de microtubuli ai axonului. La om, rata transportului este evaluată la 50–100 mm/zi și nu este influențată de prezența Ac neutralizanți. Deoarece virusul este transportat retrograd prin axoni, s-a folosit ca marker pentru identificarea căilor nervoase: proteina rabică P se asociază cu o componentă a dineinei din structura microtubulilor axonali.

Virusul ajunge în ganglioni și în SNC și se multiplică în neuroni, dar modalitatea diseminării interneuronale nu este cunoscută. Rareori virusul se multiplică în celulele gliale. După multiplicarea în sistemul limbic, animalul devine agresiv, ceea ce ușurează diseminarea. Substituția la aminoacidul 333 al glicoproteinei G duce la pierderea virulenței.

Tulpinile virulente exprimă o cantitate limitată de proteină G pe suprafața neuronilor, ceea ce limitează apoptoza numai la stadiul final al infecției, spre deosebire de tulpinile nevirulente, care exprimă o cantitate mai mare de proteină G și induc apoptoza. Disfuncția neuronală se poate datora alterării situsurilor de legare a mediatorilor sinaptici.

După multiplicarea în SNC, virusul își *modifică tropismul*: din nevrax trece centrifug prin prelungirile nervoase, inclusiv cele vegetative, până la țesuturi și organe: în glandele salivare (80% din cazuri), în epiteliul orofaringelui, dar virusul s-a izolat din mușchii striați și cardiac, din rinichi, plămân. Nu se produce viremie: virusul evită contactul cu mediul extracelular. Infecția glandelor

salivare este foarte importantă pentru diseminarea virusului prin muşcătură. În celulele acinare ale glandelor salivare, virusul se multiplică masiv şi se eliberează prin înmugurire în lumenul glandei sau în canaliculele intercelulare.

La câinele domestic, perioada de incubare este de 5 zile până la 14 luni, cu o medie de 3–12 săptămâni. Rabia canină are 2 forme clinice: *furioasă* (este infectat SNC: trunchiul, ganglionii nervilor cranieni, sistemul limbic etc.) şi *paralitică* (sunt infectaţi ganglionii nervilor spinali şi măduva). Virusul poate fi eliminat prin salivă cu 7 zile înainte de apariţia simptomelor şi animalul moare în 7 zile după declanşareea manifestărilor clinice. La mamifere, rabia nu este totdeauna fatală: câinele, pisica, liliacul şi mai ales şoarecele s-au recuperat după infecţia cu o doză mică de virus de stradă. În condiţii naturale, o doză mică de virus poate să imunizeze fără să producă rabia. 3% dintre animale se imunizează şi supravieţuiesc infecţiei naturale.

La om, perioada de incubaţie durează de la 4 zile până la mai multe luni. Clinic, infecţia are 3 faze majore: *prodromală**, *neurologică acută***, *comatoasă*.

* Faza *prodromală*, cu manifestări nespecifice, se declanşează după începerea multiplicării virale în SNC. Pacientul este iritabil, îşi pierde puterea de concentrare, cu dureri de cap, stare de rău general.

** Faza *neurologică* se caracterizează prin agitaţie (anxietate), alternanţa perioadelor de luciditate cu cele de delir, apoi deteriorare mentală, convulsii generalizate, comă, moarte. În forma furioasă a rabiei, virusul se multiplică în sistemul limbic şi în centrii nervoşi superiori, iar în forma paralitică este implicată măduva spinării şi ganglionii. Paralizia progresivă ascendentă, observată la animalele şi la omul rabic reflectă infecţia progresivă a ganglionilor rădăcinii dorsale.Tabloul patologic este influenţat de tulpina de virus sau de doza infectantă. Hidrofobia este rezultatul unei serii de reflexe spasmodice ale muşchilor inspiratori, declanşate de încercările de a bea apă, asociate cu o stare de teamă neexplicată. Obligat de sete să înfrunte teama, pacientul încearcă să bea, dar înainte de contactul cu apa, se declanşează o succesiune rapidă de respiraţii convulsive, ceea ce duce în final la stop cardiorespirator. Spasmul respirator hidrofob se datorează exagerării reflexelor protectoare (strănut, tuse, vomă) ale tractului respirator, faţă de corpurile străine.

In vitro, virusul se multiplică în culturi celulare primare de rinichi de hamster, câine, porc. Linia BHK-21 transformată de polioma este cea mai folosită pentru multiplicarea virusului rabic în scopuri experimentale, pentru că are o sensibilitate foarte marcată. Produce virus cu titru înalt cu ECP minime. Virusul se multiplică în celulele diploide umane (CDU) şi linia Vero.

Virusul de stradă se *izolează* pe culturi primare, din secreţia salivară a animalelor infectate. În 20% din cazuri, saliva animalelor rabice este negativă pentru virus. Practic, virusul rabic se găseşte în toate organele unui organism infectat.

ECP. În celulele vertebratelor, ECP apare rapid, cauzat de acumularea componentelor structurale virale cu efecte toxice. Blocarea sintezei macromoleculelor specifice celulei este rapidă. Celulele infectate secretă proteina G solubilă, mai scurtă cu 58 de aminoacizi. Anticorpii anti-G nu sunt protectori faţă de infecţia rabică. Infecţia rabică stimulează sinteza IFN. In concentraţie optimă, IFN poate împiedica îmbolnăvirea, dacă sinteza sa este timpurie.

Leziunile morfologice distincte pentru virusul rabic sunt *incluziile eozinofile* în neuronii ganglionari, pontini, corticali (în special în cornul lui Ammon), în celulele Purkinje din cerebel. Infecţia SNC este esenţială pentru diseminarea virusului.

Rabia. Infecţia rabică la om este sporadică, dar reprezintă o problemă majoră de sănătate publică, pentru că omul infectat prin muşcătura animalelor rabice sau după contactul cu saliva infectată, evoluează inexorabil spre moarte.

Virusul rabic se transmite şi pe alte căi: de la om la om, prin grefele de cornee; prin inhalarea virusului în peşterile populate cu lilieci; prin vaccinul inactivat incomplet; pe cale orală, dar este necesară o doză mare de virus

În ultimii 100 de ani, rabia este diagnosticată şi controlată pe următoarele căi:

– introducerea vaccinului rabic (Pasteur, 1885);
– descoperirea incluziilor Babeş-Negri, patognomonice pentru infecţie (1903)
– vaccinarea antirabică a câinilor (după 1940);
– administrarea serului hiperimun antirabic la om (după 1954);
– adaptarea virusului rabic în culturile de celulare (1958);

– testul anticorpilor fluorescenți pentru diagnosticul infecției pe secțiunile de creier ale animalelor infectate.

Aceste măsuri nu au fost aplicate în toate țările. Frecvența infecțiilor rabice în diferite țări se corelează invers cu complexitatea setului de măsuri.

Controlul rabiei la nivelul sursei este cel mai dificil. Virusul se menține în populațiile de animale sălbatice, prin perioada foarte lungă de incubație

Răspunsul imun. Virusul rabic este, în esență, *neuroinvaziv* și de aceea, foarte puțin accesibil reactivității imunitare. RIMH față de antigenele virale este neglijabil pe toată perioada de incubație, până la apariția simptomelor și rămâne scăzut tot timpul, sugerând că virusul evită contactul cu sistemul imunitar sau supresează răspunsul imun. La animalele infectate cu virus de stradă, IMC pare a fi supresată.

Anticorpii neutralizanți sunt induși numai de glicoproteinele învelișului și sunt protectori față de reinocularea animalelor de laborator. *In vitro*, Ac blochează atașarea virusului pe suprafața celulei. *In vivo*, titrul Ac nu se corelează cu gradul de protecție.

Vaccinul. Pasteur (1885) a utilizat vaccinul rabic inactivat, obținut prin desicarea țesutului nervos de la iepurele infectat. Vaccinul Semple (1911) este un preparat viral recoltat din creierul de iepure, oaie sau capră, inactivat cu formol și este protector față de virusul rabic, dar conține mielină și unele persoane vaccinate (1/2000) fac maladia neuroparalitică demielinizantă.

Creierul de embrion conține mai puțină mielină, astfel încât un vaccin mai sigur s-a preparat de la embrionii de rață infectați. Titrul Ac a fost mic după 10–14 doze zilnice subcutane, dar incidența neuroparaliziei a diminuat.

Vaccinurile vechi au fost înlocuite cu vaccinul obținut pe o tulpină *celulară umană diploidă,* inactivat cu β-propiolactonă. Este foarte imunogen după administrare pe cale subcutană sau intradermică. Sinteza Ac este accelerată după repetarea dozelor. Vaccinul se administrează profilactic: 3 doze la intervale de o săptămână, iar rapelul se face la fiecare 2 ani.

Anticorpii induși de glicoproteina G sunt neutralizanți, iar glicoproteina G inserată în membrana celulelor infectate este ținta limfocitelor Tc. Anticorpii neutralizanți se detectează la 7–14 zile după vaccinare.

Deși proteinele virale din vaccin sunt foarte imunogene, pacienții cu encefalită rabică sunt anergici.

Imunizarea profilactică se recomandă pentru cei ce călătoresc în ariile cu turbare canină endemică și a celor cu risc ocupațional de contact cu un animal rabid (grădini zoo, laboratoare).

Protecția post-vaccinală crește semnificativ prin imunizarea pasivă cu fracția Ig a serului antirabic (HRIG) obținut pe cal sau om, în primele săptămâni de la presupusa infecție.

Jumătate din doza HRIG este injectată la situsul mușcăturii rabice și reduce sau elimină încărcătura virală. Restul se administrează intramuscular, la alt situs. HRIG singur, chiar dacă nu este total protector, prelungește mult perioada de incubare. Faptul este foarte important pentru mușcăturile pe față sau cap, când incubația este scurtă (de 10–14 zile), înainte ca imunizarea să devină protectoare. HRIG pare să neutralizeze virusul inoculat la locul mușcăturii și să stimuleze răspunsul limfocitelor T. Serul este infiltrat profund sub/ și în jurul țesutului lezat.

Diagonsticul. Animalele rabide sunt eutanasiate imediat și creierul este testat pentru infecția rabică (WHO, 1997), prin evidențierea *incluziilor Babeș-Negri* pe secțiunile țesutului nervos din emisferele cerebrale și din cerebel. Țesutul se poate obține fără craniotomie, prin foramen magnum. Diagnosticul poate fi confirmat pe lamă, prin testul IFA (Ac imunofluorescenți anti-virus rabic), pe amprenta de creier fixată cu acetonă.

La microscopul optic, incluziile Negri sunt mase de material *eozinofilic* dens în citoplasma neuronilor, cu diametrul de 2–10 μm, în interiorul cărora se disting granule bazofile. La microscopul electronic (ME) se observă filamente dezorganizate într-o matrice amorfă ce constă dintr-o RNP rabică. Incluziile se găsesc la 75% dintre organismele infectate, cele mai numeroase fiind în hipocamp, celulele Purkinje, măduva spinării, ganglioni.

Virusul Borna infecțios pentru cal, are genom asemănător cu al rhabdovirusurilor. Spre deosebire de rhabdovirusuri, care se multiplică în citoplasmă, virusul Borna se multiplică în nucleul

celulelor infectate, ca şi rhabdoviridele plantelor. Virusul *Borna* este învelit, asemănător din punct de vedere structural cu rhabdo- şi cu paramixovirusurile şi a fost clasificat în familia *Bornaviridae*. Genomul ARN de polaritate negativă este unitar, dar este replicat şi transcris în nucleu. Dependenţa de nucleu rezidă în faptul că mesagerii virali sunt prelucraţi prin clivare şi înnădire. Virusul manifestă neurotropism foarte puternic, determină infecţii persistente şi nu lizează neuronii. Virusul Borna produce o maladie a SNC la cai şi oi în anumite zone ale Germaniei, ce se manifestă prin tulburări de comportament şi sfârşit letal. În SNC se infiltrează celule inflamatorii, care produc leziunile tisulare. Probabil, virusul Borna infectează mai multe specii de mamifere, inclusiv omul, unde poate fi implicat în patologia unor maladii cu tulburări de comportament.

21.4. Familia Filoviridae

Sunt *mononegavirale*, ca şi paramixo- şi rhabdovirusurile. Infecţiile la om sunt rare, dar manifestările de febră hemoragică cu rate înalte de mortalitate, sunt dramatice. Primul virus a fost izolat la Marburg (1967), ca rezultat a 3 episoade infecţioase simultane la personalul de laborator din Marburg, Frankfurt şi Belgrad, după importul maimuţei verzi africane (*Cercopithecus aethiops*) din Uganda. Au fost infectate 31 de persoane (7 decese) care au avut contact direct cu animalele, cu ţesuturile infectate sau cu sângele infectat. În Africa de est, virusul infectează maimuţele şi omul. In '76 şi '79 au apărut noi epidemii în Zair şi Sudan, produse de o tulpină înrudită dar distinctă: *virusul Ebola* (râu în Zair). Virusul se transmite prin contactul direct: pătrunde prin mucoase sau prin leziunile tegumentare.

Virionii sunt pleomorfi: filamente lineare, buclate sau ramificate, de unde s-a dat denumirea. Sunt printre cele mai mari virusuri cunoscute, cu o lungime variabilă de până la 14 000 nm (= 14 μm), datorită formării concatemerilor. Diametrul este de 80 nm. Nucleocapsida helicală, cu un ax central de 20–30 nm, este înconjurată de un peplos derivat din membrană, cu proiecţii de 10 nm.

In vitro, virusul se multiplică rapid, cu efect litic, în citoplasma unui spectru larg de celule. Nucleocapsidele se învelesc printr-un proces de *extruzie a membranei celulare* şi nu prin înmugurire, ceea ce explică pleomorfismul.

ARN codifică 7 proteine: nucleoproteina, o glicoproteină, o polimerază (L) şi alte 4 proteine asociate nucleocapsidei.

Glicoproteina se sintetizează în 2 variante: una solubilă, mai mică, secretată de celula infectată şi alta alcătuită din 2 subunităţi, una fiind ancorată în membrană.

Virusurile *Marburg* şi *Ebola*, agenţii febrei hemoragice africane, sunt foarte virulente pentru om şi maimuţe. Au tropism pentru celulele *sistemului fagocitar mononuclear, celulele dendritice, celulele endoteliale*. Virusurile se multiplică la titru înalt în ficat, plămâni, splină, rinichi.

Probabil că virusurile Marburg şi Ebola au o gazdă rezervor – un rozător sau un liliac şi se transmit accidental la om. Maimuţele nu constituie un rezervor de virus, pentru că infecţia este letală şi nu pot perpetua virusul.

La om, virusurile Marburg şi Ebola se transmit prin *contact fizic direct* şi prin materialele infectate: ace, secreţii, sânge, ţesuturi. Virusul infecţios pătrunde prin mucoase sau prin leziuni tegumentare. Epidemia din '67 s-a datorat contactului direct cu ţesuturile infectate sau cu echipamentul contaminat. Nu se transmite prin aerosoli. Epidemia se datorează introducerii virusurilor în comunitate de către o persoană infectată, urmată de diseminarea de la o persoană la alta.

Incubaţia este de 3–9 zile pentru virusul Marburg şi de 2–21 zile pentru Ebola. Febra hemoragică debutează brusc, cu febră, dureri de cap, artralgie şi o stare de rău extrem. Simptomele gastrointestinale (gsi) apar în a 2-a sau a 3-a zi de stare, cu dureri abdominale, diaree, vomă. Sângerarea începe în ziua a 5-a de stare, din mucoasa tractului gsi, gingii, nazofaringe, vagin. Mortalitatea este înaltă cauzată de şocul hipovolemic prin sângerare abundentă. La gravide mortalitatea este de aproape 100%.

Bibliografie

Pastoret P. P., Brochier B. 1998. *Rhabdovirus*, Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed. ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Wagner R. R. *Rhabdoviridae* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.
Wagner R. R., Rose J. K. 1996. *Rhabdoviridae:* The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. Knipe M., Howley P. M. et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Baer G. M., Bellini W. J., Fishbein D. B. 1990. *Rhabdoviruses*, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.
Bode L., Ludwig H. 2003. Borna Disease Virus Infection, a Human Mental-Health Risk – Clin. Microbiol. Rev. 16: 534–545.
Smith J. S. 1996. New Aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis and prevention of the disease in the United States – Clin. Microbiol. Rev. 9, 166–176.
Carbone K. M. 2001. Borna Disease Virus and Human Disease as a Specific, albeit chronic Infection: Diagnosis and Treatment – Clin. Microbiol. Rev. 14, 727–752.
Zuckerman A. J., Banatvala J. E., Pattison J. R., Griffith P.D., Schoub B. D. 2004. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, John Wiley & Sons, Ltd.

21.5. Familia Picornaviridae

*Picorna** sunt printre cele mai mici virusuri cu genom ARN (pico = 10^{-12}g, unitate de măsură foarte mică). Virionii sunt sferici, nuzi (fără înveliş lipidic), cu diametrul de 24–30 nm. Este cea mai mare şi cea mai importantă familie de virusuri patogene pentru om şi pentru animalele de importanţă economică. Capsida este alcătuită din 60 de subunităţi identice, aşezate după modelul simetriei icozaedrice.

* Acronimul Picorna: *p*olio *i*nsensitivity to ether, *c*oxsackie, *o*rphan.

Primul reprezentant al familiei – *virusul aftei bovine* – a fost descris în 1898 (Loeffler şi Frosch). Familia cuprinde 5 genuri:

g. ***Enterovirus*** cuprinde:

– *poliovirusurile* umane (identificate în 1909, prin inocularea maimuţei cu virusuri izolate de la pacienţii cu poliomielită*) cu 3 serotipuri. Cele 3 serotipuri de poliovirus (1, 2, 3) au antigene specifice de tip, dar şi antigene comune. Infecţia primară produce Ac cu specificitate de tip. Infecţia secundară induce sinteza Ac care neutralizează şi celelalte 2 variante antigenice;

– *virusuri Coxsackie umane A* (oraş din statul New York, unde au fost izolate) produc miozita cu inflamaţia şi necroza fibrelor musculare. Sunt 23 serotipuri (A_1– A_{22}) şi A_{24};

– *virusuri Coxsackie umane B* – produc infecţii ale nevraxului, necroza muşchilor scheletici, pancreasului, miocardului), cu 6 serotipuri (B_1–B_6);

– *echovirusuri* umane (*e*ntero-*c*ytopathic *h*uman *o*rphan), cu 28 de serotipuri. Produc infecţii respiratorii (răceala comună, bronşiolită), dar sunt printre cei mai comuni agenţi ai meningitei şi s-au asociat cu diabetul de tip I;

– *enterovirusuri umane*, cu 4 serotipuri: 68–71;

– *enterovirusuri animale*, cu 34 de serotipuri.

Virusurile enterice invadează şi se multiplică în mucoasa tractului intestinal şi pot fi grupate astfel:

– virusuri care se multiplică predominant în mucoasa intestinului subţire şi produc gastroenterita acută (rotavirusuri, calicivirusuri, adenovirusuri, astrovirusuri);

– virusuri care se multiplică la orice nivel al tractului intestinal şi produc puţine simptome enterice, înainte de a produce manifestări clinice la distanţă: virusul rujeolei, enterovirusuri (polio, coxsackie, virusurile hepatitice A şi E);

– virusuri care se disemineză în tractul intestinal în stadiile tardive ale infecţiei sistemice, în special la gazdele imunocompromise infectate cu HIV sau CMV.

g. ***Hepatovirus*** – virusul hepatitei umane A (enterovirus 72).

g. ***Rhinovirus***, adaptate la epiteliul nazofaringian. Sunt acidolabile la pH mai mic de 6 şi produc răceala comună la copii şi adulţi. Sunt 102 serotipuri de rinovirusuri umane şi 2 serotipuri bovine.

g. ***Aphtovirus*** produce leziuni veziculare (afte) la paricopitate. Virusul aftos (FMDV) are 7 serotipuri (1–7), acido-labile la pH mai mic de 6.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

g. *Cardiovirus*, rareori asociat cu maladii umane. Au fost izolate de la rozătoare, dar gazda naturală nu se cunoaşte. Are o singură variantă antigenică şi este acidostabil la pH 3. Genul cuprinde şi virusul *encefalomielitei murine Theiler*.

* Poliomielită : polios, lb. greacă = *cenuşiu*; myelos = *substanţă*.

Proprietăţi fizice. Virionii sunt sferici, cu diametrul de 24–30 nm, nuzi (fără înveliş lipidic) şi infecţiozitatea nu este modificată de solvenţi organici (eter), de deoxicolat sau de variaţi detergenţi care inactivează alte virusuri.

Preparatele virale liofilizate pierd 99,99% din titrul infecţios, ceea ce denotă că apa este esenţială pentru integritatea nucleocapsidei.

Simetria capsidei este icozaedrică, evidenţiată prin cristalografia cu raze x.

Stabilitatea la pH. Entero-, cardiovirusurile şi virusul hepatitei A sunt acidostabile, chiar la pH < de 3.

Rhino- şi aftovirusurile sunt labile la pH < de 6. Diferenţa de comportament reprezintă probabil o adaptare, deoarece enterovirusurile trebuie să traverseze stomacul pentru a ajunge la situsul de multiplicare – intestinul subţire. Rhino- şi aftovirusurile se multiplică în epiteliul mucoasei nazale şi orofaringiene.

Enterovirusurile sunt termolabile. Se inactivează rapid la 50°. Sunt stabile la temperaturi scăzute. Îşi păstrează infecţiozitatea la îngheţ pentru mulţi ani, rămân infecţioase timp de săptămâni la +4° şi câteva zile la t° camerei.

Genomul este o moleculă de *ARN monocatenar*, de polaritate pozitivă (funcţionează ca ARNm), cu o lungime desfăşurată de 2500 nm. La capătul 5'* este legată covalent *proteina genomică* (VPg = proteina genomică virală), cu rol de *primer* pentru sinteza ARN, dar şi în procesul împachetării ARN în virion, urmată de o secvenţă netradusă (ntr) de circa 750 nt. Capătul 3' conţine o secvenţă *ntr* mai scurtă şi se termină cu o secvenţă poli-A de lungime variabilă (fig. 400).

* Cele mai multe molecule de ARNm ale eucariotelor necesită un capăt 5' liber al ARNm, bonetat cu o guanozină metilată, importantă pentru legarea ribosomilor, iar iniţierea internă a traducerii nu este posibilă.

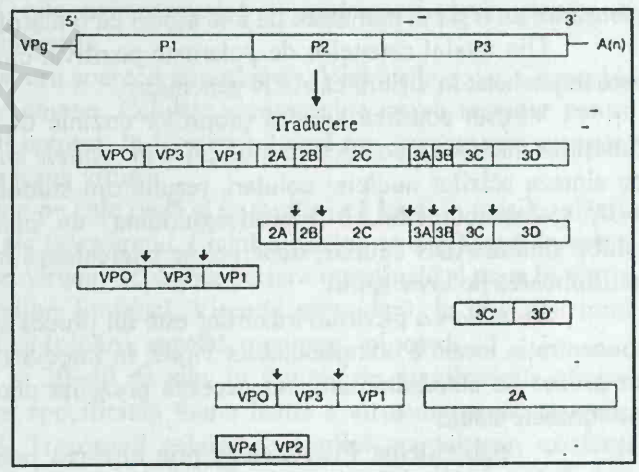


Fig. 400. Sus, organizarea genomului *Picorna*. ARN viral este asociat cu o proteină bazică, VPg (proteina virală genomică) la capătul 5', iar la capătul 3' are o secvenţă de acid poliadenilic – A(n). La cele două capete, se găsesc secvenţele netraduse (ntr). Funcţional, genomul este divizat în 3 regiuni de codificare: P_1, P_2, P_3. Jos, ARN viral este tradus într-o proteină gigantă, clivată succesiv de proteaze. Cu excepţia clivajului autocatalitic care eliberează VP_0 VP_3 şi VP_1 şi al clivajelor alternative mediate de proteaza 2A, care generează 3C' şi 3D', toate celelalte clivaje sunt mediate de proteaza 3C, ale căror situsuri sunt indicate de săgeţi (după Patick şi Potts, 1998).

Secvenţa 5'ntr a picornavirusurilor conţine un situs intern de intrare a ribosomilor (IRES = internal ribosome entry site), care permite legarea ribosomilor în absenţa bonetei terminale 5'. Regiunea genomică codificatoare a poliproteinei, este flancată la fiecare capăt de secvenţele *ntr*. Secvenţa codificatoare este împărţită în 4 regiuni (*L* codifică sinteza *proteinei Leader*, P_1–P_3), ce corespund produselor de clivaj primar al proteinei. Regiunea codificatoare a ARN este organizată într-un singur cadru de citire (ORF), fiind tradusă ca un mesaj unitar (monocistronic) într-o *poliproteină* de circa 2200 aminoacizi. Poliproteina include 2 secvenţe ce au rol de enzime proteolitice (proteaze intramoleculare) şi clivează proteina la poziţii specifice chiar în timpul traducerii (înainte de terminarea sintezei), astfel că o poliproteină de lungime reală nu se detectează în celulele infectate.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Clivajul primar al poliproteinei, sub acțiunea proteazelor generează polipeptidele P_1, P_2, P_3. Ulterior ele sunt clivate de 3 proteaze în 4, 3 și respectiv 4 produse finale și generează 11 molecule (chiar 12, pentru virusurile care codifică proteina leader). Cele mai multe clivări ale poliproteinei le catalizează *proteaza 3C*, sau precursorul ei, 3CD.

Proteina 3B este chiar VPg, 3D este ARN-polimeraza, iar 2C – o ATP-ază. Proteinele 2A, 3C sunt NS.

Secvențe genomice: ntr-750 nt L P1(precursor capsidă) P2 P3(replicaze) ntr
Proteine: 5'Vpg O----------L vP4 vP2 vP3 vP1 2A 2B 2C 3A 3B 3C 3D ---------- 3'AAAA.

Polimeraza 3D catalizează poli-uridilarea VPg, folosind secvența poli-A ca matriță. VPg-poliU are rol de primer pentru sinteza ARN de sens negativ.

Cultivare. Enterovirusurile se multiplică în CDU (celule diploide umane) și produc ECP caracteristic. In mediu agarizat se formează plaje de liză. Determinarea numărului de plaje de liză este o metodă de titrare.

Ciclul de multiplicare

Enterovirusurile au un tropism tisular accentuat. Receptorii pentru poliovirus sunt *glicoproteine* cu *acid sialic*, deoarece sunt inactivați de NA. Sunt sensibili la tripsină și se regenerează în 1–2 ore. Moleculele receptoare de virus au rol în legarea *factorilor de creștere*, iar altele sunt *integrine*, având rol în aderența intercelulară.

Virionii sunt încorporați în celulă prin *viropexie* (endocitoza mediată de receptori). Pe la vârfurile icozaedrului, capsomerele pentagonale pierd una din cele patru proteine (VP_4) și ARN este eliberat în celulă. ARN genomic este tradus în poliproteina clivată ulterior în P_1, P_2, P_3.

Replicarea ARN se realizează prin intermediul *formei dublu catenare* și a *intermediarului de replicare*. Catena genomică de *polaritate pozitivă* are rol de matriță pentru sinteza catenei de *polaritate negativă* (antigenomică). In molecula dublu catenară, catena de polaritate negativă are rol de matriță pentru sinteza ARNm și a ARN genomic. Aparatul enzimatic este același pentru sinteza ambelor categorii de ARN. Din totalul ARN viral sintetizat în celula infectată, proporția moleculelor ARN de polaritate pozitivă este de 20–50 de ori mai mare decât a celor de polaritate negativă. Astfel, ribosomii au o șansă mai mare de a se asocia cu o matriță pozitivă decât cu una de polaritate negativă.

Din totalul catenelor de polaritate pozitivă, circa jumătate funcționează ca ARNm, iar restul este împachetat în virioni ca ARN genomic.

Virusul codifică sinteza propriilor enzime de replicare genomică. Nu necesită participarea funcțiilor nucleare, deoarece se multiplică în *celulele enucleate*. Independența replicării ARN genomic de sinteza acizilor nucleici celulari, rezultă din studiile cu inhibitori metabolici. *Inhibitorii sintezei ADN* (5-bromouracilul, 5-fluorodeoxiuridina) nu inhibă multiplicarea virusului. Actinomicina D inhibă sinteza ADN celular, deoarece se intercalează între bazele ADN dublu catenar, dar nu inhibă multiplicarea poliovirusului.

Asamblarea picornavirusurilor este un proces spontan (autoasamblare) și este determinată de concentrația locală a componentelor virale, în imediata vecinătate a membranei citoplasmatice. Fiind un proces de autoasamblare, nu necesită prezența unor factori catalizatori. Asamblarea decurge în următoarele stadii:

- poliproteina P_1, rezultată prin clivarea polipeptidului gigant, se asociază în ansambluri pentamerice. 5 molecule P_1 formează un *pentamer*;
- 12 ansambluri pentamerice formează o *precapsidă* și la exteriorul ei se asociază ARN genomic;
- în etapa a III-a are loc clivarea proteinei P_1 în VP_0, VP_1, și VP_3;
- în etapa a IV-a se produce clivarea finală și rezultă VP_1, VP_2, VP_3 și VP_4, concomitent cu internalizarea genomului.

După clivarea proteinei P_1 rezultă capsida alcătuită din 60 de capsomere de formă triunghiulară (fig. 401), grupate în pentameri. Fiecare capsomeră este alcătuită din cele 4 proteine: VP_1 (1A), VP_2 (1B), VP_3 (1C), VP_4 (1D). Proteinele 1, 2, 3 ocupă vârfurile triunghiului, iar cea de a IV-a este situată într-un *plan inferior*, probabil în contact cu ARN genomic.

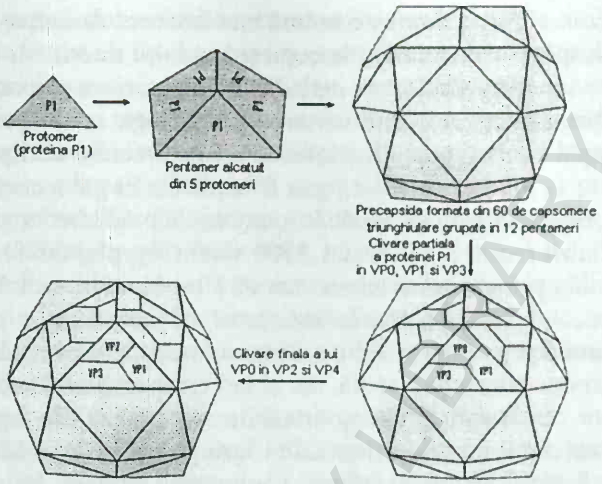


Fig. 401. Asamblarea capsidei picornavirusurilor. 5 molecule ale proteinei P1 se asociază şi formează un pentamer. 12 pentameri (fiecare cu câte 5 proteine P1) se asamblează într-o precapsidă. Proteina P1 se clivează parţial în VPo, VP1 şi VP3, iar ulterior, VPo este clivată în VP2 şi VP4. VP4 este aşezată în plan posterior.

Împachetarea genomului rămâne o problemă esenţială a morfogenezei picornavirusurilor. Genomul ARN se înfăşoară în jurul precapsidei şi induce modificarea conformaţiei proteinelor. Unele capside rămân goale.

Timpul necesar pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare, de la infecţie până la asamblarea virionilor este de 5–10 ore. Randamentul infecţiei este de 25–100.000 virioni/celulă.

Studiul multiplicării picornavirusurilor a stat la baza a trei descoperiri importante:

– s-a demonstrat existenţa unei *ARN-polimeraze dependentă de ARN;*

– s-a identificat *forma de replicare dublu catenară* a ARN viral;

– s-a identificat sinteza unei *poliproteine* mari, care este supusă clivajului prin proteoliză din care rezultă proteinele funcţionale, ceea ce reprezintă o diferenţă majoră a procesului de traducere virală faţă de traducerea celulară.

Spectrul de gazdă variază mult de la un serotip la altul. Poliovirusurile au un spectru restrâns: în condiţii de laborator, cu un inocul masiv, infectează şi produc paralizia la maimuţă, după inoculare intracerebrală sau intraspinală. Infecţia orală este asimptomatică şi maimuţele devin purtătoare intestinale. În condiţii naturale, omul este singura gazdă.

Virusurile Coxsackie sunt infecţioase pentru şoarecii nou-născuţi. Virusurile polio, Coxsackie şi echo- recunosc acelaşi receptor al celulelor umane. Celulele rozătoarelor nu au receptor pentru virusurile polio şi nu pot fi infectate de virusul natural. In hibrizii celulari om-şoarece este necesară gena umană pentru exprimarea receptorilor care leagă virusul.

La om, poliovirusul pătrunde în organism pe cale orală şi se multiplică local în tonsile, plăcile Peyer, celulele epiteliale ale *nazofaringelui* şi ale *intestinului.* Ciclul infecţios se desfăşoară în aceste celule şi asigură perpetuarea sa în natură. Uneori virusul depăşeşte bariera intestinală şi trece în sânge. Faza *viremică* este urmată de infecţia ganglionilor limfatici. Viremia secundară, la titru mai mare poate fi urmată de infecţia organelor ţintă: măduva spinării, encefal, meninge, miocard.

Perioada de incubaţie variază între 2 şi 30–40 de zile, în funcţie de manifestările clinice. Forma paralitică a infecţiei este consecinţa unei specificităţi foarte înalte a virusului pentru neuronii din coloanele anterioare ale măduvei spinării. Tropismul celular se explică parţial prin existenţa moleculelor receptoare specifice, implicate în legarea virusului. Existenţa receptorilor nu explică în totalitate tropismul, deoarece sunt numeroase situaţii de infecţie abortivă, în care infecţia este iniţiată (virionul este internalizat şi genomul este dezvelit), dar este stopată într-o etapă ulterioară, ceea ce sugerează existenţa unor factori celulari, cu rol specific pentru sinteza macromoleculelor esenţiale ale ciclului de multiplicare virală (ARN, proteine).

Paralizia apare la un număr mic din totalul infecţiilor. Semnul predominant este paralizia flască acută, datorită leziunii neuronilor motori. Decesul se poate datora paraliziei muşchilor respiratori. Epidemia de poliomielită apare în lunile de vară, în zonele temperate. Uneori, la mai mulţi ani după recuperarea din atacul de poliomielită, unii pacienţi fac o insuficienţă motorie – sindromul post-poliomielitic, probabil datorat infecţiei persistente a neuronilor, cu virusul polio.

Encefalita este indusă mai frecvent de herpes simplex, dar şi enterovirusurile sunt recunoscute ca agenţi ai encefalitei la copii şi la adulţii tineri.

Miocardita, o maladie inflamatorie a miocardului, este produsă de virusurile Coxsackie B. Diagnosticul necesită examenul histologic al biopsiei endocardului. Miocardita neonatală poate fi rapid fatală şi poate fi confundată cu o maladie cardiacă congenitală.

Echovirusurile par a fi implicate în patogeneza cardiomiopatiei dilatative şi a diabetului de tip I, deoarece s-au izolat de la persoanele prediabetice şi diabetice de tip I, iar în sângele unor pacienţi cu diabet recent s-a detectat ARN viral (Hyypia, 2008). Echovirusurile şi alte enterovirusuri par a avea rol în patogeneza sclerozei amiotrofice laterale, o disfuncţie neurologică cronică progresivă.

Cardiomiopatia dilatativă (CMD) este o maladie postinflamatorie, cauză a insuficienţei cardiace şi a morţii subite. Singurul tratament este transplantul cardiac. S-a dovedit că enterovirusurile produc miocardita acută, dar şi infecţia persistentă asociată cu miocardita cronică şi cu CMD.

Izolare. Picornavirusurile se izolează din organele infectate. Enterovirusurile se izolează din conţinutul intestinal, spălătura faringiană, LCR, măduva spinării, creier, miocard (numai la copiii cu infecţie fulminantă), sânge, conjunctiva oculară, leziuni ale pielii. Metoda clasică a izolării utilizează culturi de celule de rinichi de maimuţă, urmată de identificarea ulterioară prin *serotipizare*.

ECP. La 30 de min. după infecţie se produce "efectul de întrerupere", adică inhibiţia rapidă a sintezei proteinelor celulare prin următoarele mecanisme:

– *inhibiţia transcrierii ARNm celulari* sub acţiunea unui factor codificat de virus care *inactivează ARN polimeraza II* celulară;

– *inhibiţia rapidă a traducerii ARNm celulari* preexistenţi sub acţiunea unui alt factor viral care inhibă un *factor celular de iniţiere a traducerii* (care se leagă la m^7G);

– *disocierea ribosomilor* de mesagerii celulari.

Cromatina îşi pierde textura microscopică omogenă şi se condensează în blocuri heterocromatice, asociate feţei interne a membranei (fenomenul de marginaţie). Se modifică componenţa histonelor. Modificările apar în decurs de o oră.

Diagnosticul serologic. Trăsătura dominantă a picornavirusurilor este numărul mare de serotipuri* – peste 217 şi cifra este în creştere.

**Numărul mare de serotipuri* de enterovirusuri, şi în special al rhinovirusurilor, se explică prin aceea că ARN-polimeraza schimbă frecvent matriţa. Fiecare *serotip* corespunde unei variante antigenice şi este definit de capacitatea unui *ser monospecific* de a-i neutraliza infecţiozitatea.

Serul monospecific se obţine prin imunizarea unui organism, neexpus anterior la contactul cu un virus înrudit. De exemplu, un izolat de virus polio este identificat ca tip 1, dacă infecţiozitatea lui este diminuată cu un factor stabilit convenţional (de ex., 100), în prezenţa unui ser de referinţă obţinut faţă de virusul de colecţie, definit ca tip 1.

Un alt serotip de polio este definit de incapacitatea aceluiaşi ser de referinţă de a neutraliza o altă variantă antigenică de virus, izolat din aceiaşi sursă şi care produce manifestări clinice identice.

Chiar în cadrul aceluiaşi serotip pot să apară mici diferenţe antigenice între diferitele izolate, dar Ac specifici faţă de o variantă a unui serotip sunt protectori faţă de oricare variantă a aceluiaşi serotip.

Identificarea serologică a celor 66 de serotipuri de enterovirusuri umane este greoaie. De aceea serurile hiperimune specifice, obţinute pe cal, au fost amestecate şi s-au obţinut diferite *combinaţii de antiseruri*.

Izolatele de enterovirusuri se incubează cu fiecare amestec de seruri şi se inoculează în substratul celular sensibil. După o incubare de câteva zile, se înregistrează aspectul neutralizării. Apoi varianta antigenică suspectată ca fiind un enterovirus se confirmă prin neutralizarea cu antiserul cu specificitate de tip antigenic.

Metoda diagnosticului serologic al infecţiei cu enterovirusuri este complicată de numărul mare de serotipuri şi de absenţa unui Ag de grup care să dea reacţie încrucişată cu toate antiserurile cu specificitate de tip. Metoda este dezavantajoasă: necesită timp, este costisitoare, disponibilitatea antiserurilor este limitată, apar unele virusuri netipabile (pot să conţină amestecuri de enterovirusuri).

Multe laboratoare utilizează metoda imunofluorescenţei directe (IFD), cu AMC marcaţi fluorescent, cu reactivitate de grup, iar tipul se identifică cu AMC cu specificitate de tip. Metodele moleculare (hibridarea ADNc, RT-PCR) au revoluţionat diagnosticul infecţiilor cu enterovirusuri, în special a celor care infectează SNC sunt rapide (rezultatele se obţin în câteva ore) şi economice.

Epidemiologie. Picornavirusurile se transmit prin intermediul aerosolilor infectaţi şi pe cale digestivă, prin ciclul fecal-oral, în condiţii igienice precare. Aftovirusurile sunt printre cele mai contagioase virusuri cunoscute. Situsul primar al multiplicării este ţesutul epitelial respirator şi

intestinal. Două sau mai multe enterovirusuri se pot propaga simultan în tractul digestiv, dar de multe ori apare fenomenul de *interferență*. Astfel, o infecție cu un enterovirus poate bloca vaccinul polio atenuat să se multiplice în intestin și pentru a conferi imunitate este necesară revaccinarea. Multiplicarea primară poate fi urmată de viremie și enterovirusurile infectează organele țintă secundare. Transmiterea respiratorie pare a fi importantă în zonele cu standarde bune de igienă, iar în condiții de igienă precară, enterovirusurile se transmit prin alimentele vegetale contaminate și prin apă. Infecția situsului primar este adeseori asimptomatică. De aceea, mai mult de jumătate dintre echovirusuri s-au izolat din focare de infecție secundară, în special din SNC.

Patologie. Poliomielita este cea mai gravă maladie cauzată de enterovirusuri. Poliovirusul se multiplică în tonsile, în ganglionii limfatici din regiunea gâtului, în plăcile Peyer din mucoasa intestinului subțire. SNC poate fi invadat pe cale sanguină. Implicarea nervoasă se poate produce la copiii care, în momentul tonsilectomiei aveau infecție inaparentă.

Poliovirusul poate infecta anumite tipuri de neuroni și rezultatul poate fi liza. Cele mai sensibile celule sunt motoneuronii medulari, dar în cazurile severe sunt infectați neuronii din coloanele posterioare și din ganglionii rădăcinii dorsale. In nevrax, substanța reticulată, nucleii vestibulari, vermisul cerebelos, nucleii profunzi ai cerebelului sunt cei mai afectați. Cortexul este cruțat, cu excepția cortexului motor din girul precentral. Modificările apar rapid: de la cromatoliză medie, până la neuronofagie și liză. Celulele afectate, dar nelezate, își pierd temporar funcțiile datorită edemului, dar se pot recupera complet. In majoritatea cazurilor, infecția cu poliovirus este *inaparentă*.

Patogeneza cu enterovirusuri non-polio este asemănătoare în stadiile inițiale ale infecției, dar organul țintă este variabil. Unele infectează SNC și produc meningite sau paralizii, altele infectează mușchiul cardiac la copii (grupul coxsackie B) și chiar pancreasul.

Singurul vaccin al unui enterovirus este obținut din virusul polio, multiplicat în celulele de rinichi de maimuță. *Vaccinul polio* cu virus inactivat (Salk), a fost introdus în 1955, iar după 1960 s-a folosit pe scară largă *vaccinul atenuat* (Sabin) al celor 3 tulpini. In perioada '55–'67 s-a realizat o reducere cu 99% a cazurilor de poliomielită în populațiile vaccinate.

Vaccinul inactivat are câteva avantaje:

– induce un nivel adecvat al Ac serici și conferă imunitate humorală;

– elimină riscul mutației de reversie la virusul virulent;

– se poate administra persoanelor imunodeficiente și celor supuse terapiei imunosupresoare;

– nu introduce în comunitate virusul infecțios care se poate răspândi necontrolat în populație;

– se poate administra copiilor în asociație cu vaccinul trivalent DTP (diftero-tetano-pertussis).

Dezavantaje:

– vaccinul polio inactivat induce un nivel scăzut al imunității locale (intestinale), astfel că tulpinile sălbatice de poliovirus se pot multiplica în intestinul persoanelor vaccinate. Anticorpii serici conferă protecție față de infecția paralitică, dar virusul excretat este sursă de infecție pentru indivizii nevaccinați;

– vaccinul inactivat este mai costisitor decât cel infecțios. Linia Vero în pasaj continuu a rezolvat problema substratului celular, înlocuind creșterea maimuțelor pentru rinichi.

Vaccinul polio infecțios are câteva avantaje:

– induce o imunitate de durată;

– administrarea orală este mai ușoară;

– tulpina atenuată induce sinteza rapidă a Ac, dar infectează tractul alimentar și interferă cu infecția virusului epidemic;

– este mai ieftin și nu necesită repetarea dozei;

– virusul atenuat din vaccin este infecțios, se multiplică în intestinul celor vaccinați, este eliminat și infectează persoanele nevacinate cărora le induce o stare de imunitate solidă.

Dezavantaje:

– virusul atenuat poate să sufere mutație de reversie la o formă suficient de neurovirulentă pentru a produce paralizie la cei vaccinați sau la contacții lor;

– virusul din vaccin se diseminează la persoanele din comunitate. Acest fapt poate fi avantajos, dar dacă virusul progen este o mutantă neurovirulentă, dezavantajul este enorm. S-au semnalat cazuri de poliomielită asociate în timp și spațiu cu administrarea vaccinului atenuat. Nu se știe cert dacă aceste cazuri sunt determinate de virusul din vaccin sau de virusul sălbatic;

– vaccinul cu virus atenuat trebuie menținut la t° constantă sub 10°, pentru că altfel virusul este instabil. Se poate păstra la îngheț, dar după dezgheţare trebuie păstrat cel mult 30 de zile la t° frigiderului.

Infecțiozitatea enterovirusurilor poate fi păstrată chiar la 50°, dacă se stabilizează cu $MgCl_2$ 1M. Vaccinul stabilizat poate fi menținut peste un an la 4°.

În primele luni de viață se administrează vaccin inactivat şi ulterior vaccin atenuat. Combinația este foarte utilă pentru zonele cu risc mare de infecție.

Poliomielita nu este eradicată, pentru că vaccinul atenuat conține un virus mutant care, în timp poate creşte neurovirulența.

Se încearcă obținerea unui vaccin fără acid nucleic viral, care să conțină numai polipeptidele selectate stimulatoare ale răspunsului imun protector.

Virusul hepatitei A

Termenul de *hepatita A* şi *B* a fost introdus în 1947 (Mac Callum), pentru a diferenția hepatita infecțioasă (epidemică) de cea serică (icter seric).

Proprietățile fizice şi biochimice ale VHA sunt asemănătoare cu ale enterovirusurilor şi inițial a fost considerat ca enterovirus tip 72. Este un virus nud, care morfologic nu se distinge de alte picornavirusuri. Capsida este alcătuită din capsomere, fiecare fiind formată din 3 sau 4 proteine. Este rezistent la t° şi la agenții chimici care inactivează multe picornavirusuri. Genomul HAV are polaritate pozitivă şi este tradus monocistronic într-o poliproteină. Totuşi, VHA se deosebeşte de enterovirusuri prin secvența nucleotidelor genomice şi a aminoacizilor proteinelor capsidale şi a fost clasificat în g. *Hepatovirus*.

VHA se adaptează greu în cultura de celule şi se multiplică încet, fără ECP. Se crede că hepatotropismul este mediat de IgA asociat cu particula virală. Complexul IgA-virus se fixează pe hepatocit printr-o asialoglicoproteină cu rol de receptor.

Se cunosc 4 genotipuri şi un singur serotip, deoarece VHA are un grad înalt de conservare antigenică. Situsul antigenic dominant, foarte probabil, conformațional, inductor al RIMH este comun pentru toate variantele genotipice, iar anticorpii au efect neutralizant.

Genomul VHA (de 7478 nucleotide) cuprinde 3 regiuni:

– o regiune 5' necodificatoare, care cuprinde circa 10% din genom (733 baze);

– un cadru de citire, ce codifică proteinele virale P_1 (proteine capsidale), P_2 şi P_3 (proteine nestructurale);

– o scurtă secvență necodificatoare 3' (64 baze);

VHA este stabil la pH 3 (ca toate enterovirusurile) şi rezistent la eter, cloroform, freon (dichloro-difluoro-metan), deoarece din compoziția chimică lipsesc lipidele.

VHA este mai rezistent la căldură decât alte picornavirusuri: este stabil la 60° timp de 60 de min., spre deosebire de alte picornavirusuri care-şi pierd infecțiozitatea la 56° în 30 de min. VHA se dezintegrează la 61°.

$MgCl_2$ 1M stabilizează virusurile şi dezintegrarea se produce la 81° pentru VHA şi la 61° pentru polio.

Infecția naturală urmează ingestiei alimentelor contaminate cu VHA de origine fecală. Secvența evenimentelor de la intrarea pe cale digestivă până la declanşarea hepatitei nu este cunoscută.

La copiii mai mici de 6 ani, majoritatea infecțiilor (70%) sunt subclinice, iar cele clinice, sunt anicterice.

Perioada de incubație este de 15–50 zile, după care apar simptomele nespecifice urmate de cele gastrointestinale. Perioada icterică durează mai puțin de 2 luni, dar 15–20% dintre pacienți pot avea manifestări clinice extinse pe circa 6 luni. Hepatita fulminantă este rară şi se produce la copiii de vârstă şcolară şi la adulții vârstnici cu maladie hepatică cronică de fond.

Sediul principal al multiplicării este *hepatocitul*, cu viremie, este secretat în secreția biliară şi este eliminat în scaun. Fecalele pot să conțină 10^9 virioni/gram şi sunt sursa principală a infecției cu VHA. VHA s-a detectat în saliva umană, ceea ce denotă că timpuriu, multiplicarea are loc în orofaringe şi în glandele salivare, ca şi pentru polio. În infecția experimentală la maimuță, Ag VHA s-a găsit în splină şi rinichi.

Titrul viral maxim în materialul fecal este atins înainte de faza icterică şi scade după icter.

Cultivare. VHA se izolează şi se propagă cu dificultate în câteva tipuri de culturi celulare umane şi neumane: culturi de AGMK, fibroblaste umane, CDU, culturi celulare de rinichi. *In vitro*, VHA necesită o perioadă de adaptare pentru cultivare, iar după adaptare produce infecţii persistente şi se atenuează (nu mai determină infecţia după inoculare la maimuţe). Cantitatea de virus este mică, iar ECP este minim.

Epidemiologie. Infecţia cu VHA se propagă în condiţii de igienă precară. Persoanele supuse riscului infecţiei: călători în ariile endemice*, consumatorii de moluşte preparate insuficient, consumatorii de droguri.

* Evoluţia endemică este definită prin apariţia cazurilor relativ rare de infecţie care se menţin numeric constante într-o colectivitate şi apar cu o relativă regularitate, de obicei sezonier, la intervale variabile de timp. Majoritatea indivizilor populaţiei sunt rezistenţi la infecţia cu agentul infecţios.

ECP constă în creşterea volumului celular, liza membranei, picnoză nucleară. Cauzele lizei hepatocitelor nu se cunosc: liza hepatocitelor poate fi consecinţa multiplicării virusului sau a răspunsului imun anti-virus. Cu cât pacientul este mai tânăr, cu atât infecţia este mai uşoară. Majoritatea pacienţilor se recuperează complet, progresia la ciroză fiind foarte rară.

Patologie. Probabil că majoritatea infecţiilor cu VHA sunt subclinice. Infecţia simptomatică este acută, de obicei autolimitată, rareori (0,1–0,2%) având o evoluţie fulminantă, fatală. Perioada de incubaţie este de 2–6 săptămâni, cu o medie de 4 săptămâni. În 10% din cazuri se produce icter. Faza icterică durează 2–22 de zile. Principalii parametri biochimici ai infecţiei constau în creşterea ALT (alanin-aminotransferaza) şi mai puţin a AST (aspartat-aminotransferaza), al căror nivel seric se corelează direct cu gradul leziunilor hepatice. Liza celulelor hepatice este cea mai amplă în zonele periportale, asociate cu infiltratul mononuclear.

Recuperarea este însoţită de protecţie imună solidă pentru tot restul vieţii, mediată de Ac circulanţi şi poate fi transferată pasiv.

Diagnosticul se confirmă prin evidenţierea virusului în scaun sau prin creşterea titrului de anticorpi specifici. Testul serologic este mai fidel, deoarece până ce pacientul se adresează medicului, organismul se poate steriliza. Serul recoltat în câteva săptămâni de la declanşarea simptomelor conţine Ac specifici antivirali, aproape exclusiv IgM.

Vaccin. Se foloseşte un *vaccin inactivat* cu formol, obţinut dintr-un omogenat de ficat de marmotă infectată sau preparat viral obţinut în culturi celulare, inactivat cu formol sau β-propiolactonă.

Tulpinile virale *atenuate* prin pasaje succesive la primate, nu produc hepatită. Au fost multiplicate în fibroblaste diploide umane.

Imunizarea pasivă cu HNIG (Human nonspesific IgG). Administrarea înainte de expunere a redus incidenţa infecţiei cu 90%.

Virusul hepatitei E

VHE a fost descoperit în 1980 ca agent etiologic al unei epidemii de hepatită, în India, transmisă prin apa de băut. Pacienţii au rămas negativi pentru Ac anti-HAV. VHE are un genom ARN mc, de polaritate pozitivă, poliadenilat la capătul 3'. Se deosebeşte de VHA prin aceea că secvenţa codificatoare este transcrisă în 3 cadre de citire, flancate de secvenţe scurte *netraduse* 5' şi 3'.

Are însă numeroase asemănări cu VHA:

- ambele virusuri hepatitice (A şi E) produc *infecţii autolimitate*, asociate cu inflamaţia ţesutului hepatic;
- ambele se transmit prin *ciclul fecal-oral*, ceea ce le distinge de celelalte virusuri hepatitice;
- se multiplică în *hepatocite* şi sunt excretate prin secreţia biliară în intestin, iar în final se elimină la un titru înalt în materialul fecal al indivizilor infectaţi (10^6–10^8 virioni infecţioşi/g de conţinut intestinal;
- sunt *virusuri nude*, ceea ce le conferă rezistenţă şi stabilitate în secreţia biliară;
- sunt eliminate direct în mediul extern, ceea ce favorizează *epidemiile explozive*, care nu există la celelalte virusuri;

– se multiplică lent şi ineficient *in vitro*. Titrul maxim este atins în câteva săptămâni. Pasajele repetate măresc randamentul de multiplicare şi intervalul de timp se scurtează;
– nu produc infecţii persistente, nu sunt asociate cu hepatita cronică şi nici cu CHC.

În 1990 genomul s-a secvenţiat, iar ulterior s-au identificat tulpini infecţioase pentru porc şi respectiv pentru puiul de găină. Dovezile epidemiologice sugerează că hepatita E este o zoonoză, porcul şi alte specii fiind rezervoare naturale de virus.

Iniţial VHE a fost clasificat, provizoriu, în familia *Caliciviridae*. Ulterior a fost denumit *Hepevirus* şi atribuit familiei *Hepeviridae*, neacceptată de ICTV (Meng, 2008).

Rhinovirusuri

Denumirea (Rhino) reflectă locul primar al infecţiei cu aceste virusuri – epiteliul cavităţilor nazale. Primul rhinovirus a fost izolat în 1957, iar în 1960 s-au izolat virusurile care produc ECP pe culturi de rinichi de embrion uman. S-au identificat peste 100 de serotipuri, numerotate prin antiserul specific, într-un program de colaborare sprijinit de OMS. Procesul mutaţional şi cel de selecţie sub presiunea factorilor imunitari selectează tipuri antigenice noi de rhinovirusuri.

Structura s-a evidenţiat prin metoda cristalografiei cu raze x, la nivelul rezoluţiei atomice. Capsida este alcătuită din 60 de subunităţi identice, distribuite în 12 pentameri într-un icozaedru. Fiecare subunitate constă din 4 proteine structurale: VP1-VP4. VP1-3 sunt localizate la suprafaţă şi interacţionează cu Ac specfici. VP4 este localizată la interiorul capsidei, asociată strâns cu ARN genomic. 5 subunităţi VP1 delimitează o depresiune ce formează un canion, inaccesibile regiunii Fab a Ig. De aceea s-a presupus că acesta este ligandul pentru receptorul celular.

Genomul, ARN monocatenar, are 7200 nucleotide: o secvenţă 5' necodificatoare de 620 nucleotide şi o secvenţă 3' necodificatoare de 50 nucleotide, ce preced secvenţa poli-A.

Receptorii pentru rhinovirusuri. Rhinovirusurile pătrund în organism la nivelul mucoasei nazale, prin intermediul aerosolilor şi al mâinilor infectate, la nivelul conjunctivei sau al mucoasei orale şi se multiplică în special în celulele epiteliale ale tractului respirator superior, dar şi în epiteliul traheo-bronşic. Rhinovirusurile grupului *major* se ataşează de *molecula de aderenţă intercelulară* (ICAM-1). ICAM-1 (o glicoproteină de 95 kDa din suprafamilia Ig), în condiţii fiziologice are rol de receptor pentru Ag1 al limfocitelor (LFA1 = lymphocyte function associated Ag-1). Astfel, ICAM uşurează interacţiunea limfocitelor cu CPA şi migrarea lor la situsul inflamator. Situsurile de legare ale LFA-1 şi ale rhinovirusurilor grupului major pe molecula ICAM sunt distincte, dar se suprapun semnificativ. În funcţie de receptorul celular, rhinovirusurile aparţin grupului major (90%) şi grupului minor (10%). Rhinovirusurile grupului *minor* se leagă de receptorul pentru LDL (low density lipoproteins), incluzând şi receptorul pentru VLDL.

Infecţia este iniţiată de doze mici de virus, dacă inoculul ajunge în nazofaringe. Evoluţia infecţiei depinde atât de doza de virus, cât şi de titrul Ac serici. Perioada de incubaţie este de 1–4 zile. Eliminarea virusului este maximă la 2–4 zile de la infecţie. Nu există fază viremică. Rhinovirusurile infectează numai omul. Nu s-au izolat de la animale.

Infecţia induce sinteza unui număr mare de citokine proinflamatorii (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, TNF α, IFNγ) şi antiinflamatorii (IL-1Ra, IL-10), dar produce ECP minim al celulelor mucoasei nazale: edemul şi infiltrarea uşoară a neutrofilelor sunt modificările histologice cele mai evidente, asociate cu secreţia catarală. Secreţia nazală are un conţinut ridicat de proteine (albumina, IgG şi proteinele glandelor mucoase – lactoferina, lizozim, sIgA), datorită creşterii permeabilităţii vasculare mediată de aminele şi secreţiei glandulare stimulată de reflexele colinergice.

Situsul primar al multiplicării rhinovirusurilor este epiteliul nazal, dar infecţia poate progresa la nivelul traheii. Infecţia nu produce un ECP detectabil al epiteliului, dar induce edemul mucoasei cu uşoară infiltrare a celulelor inflamatorii, mai ales neutrofile. Frecvenţa mişcărilor ciliare diminuează şi odată cu ele, rata de clearance mucociliar. In secreţia nazală creşte concentraţia proteinelor plasmatice: albumină, IgG şi a proteinelor secretate de glandele epiteliului (lactoferină, lizozim), datorită creşterii permeabilităţii vasculare. Modificările reflectă creşterea permeabilităţii vasculare.

Infecţia celulelor epiteliale şi infiltrarea neutrofilelor este asociată cu eliberarea unui spectru larg de IL proinflamatorii: IL-1β, -2, -4, -6, -8, -11, -12, -13 etc. Edemul mucoasei şi infiltrarea celulelor inflamatorii pot induce complicaţii: otita, sinuzita. Infecţia cu rhinovirusuri potenţează răspunsul alergic.

Virusurile se izolează din secreţiile orale, ale orofaringelui şi chiar din materiile fecale. Injectarea la voluntari, a unor doze mari de rhinovirusuri, direct în intestinul subţire, nu a produs infecţie. Aceasta sugerează că diferenţa majoră dintre rhinovirusuri şi enterovirusuri, cu privire la capacitatea de a induce infecţii intestinale, nu rezidă în sensibilitatea rhinovirusurilor la mediul acid al stomacului.

Patologie. Majoritatea infecţiilor sunt asimptomatice. Afecţiunea tipică a infecţiei cu rhinovirusuri implică tractul respirator superior şi este *răceala comună*, cea mai frecventă cauză a morbidităţii virale la om. Situsul major al simptomelor răcelii este mucoasa nazală: strănutul, obstrucţia nazală, secreţia nazală abundentă (rinoree), dureri în gât, de cap, tuse, frisoane şi, rareori, febră. Expunerea la frig nu creşte sensibilitatea la infecţie. Statutul nutriţional al organismului şi densitatea populaţiei sunt factori majori ai riscului de infecţie. Perioada de incubaţie este de 1–2 zile, simptomele ating intensitatea maximă la 2–3 zile şi durează 5–7 zile. Rareori, se extind pe durata a 2-4 săptămâni. Severitatea simptomelor este strict individuală şi se corelează cu starea fiziologică generală a organismului, cu memoria imună indusă de infecţiile anterioare cu rhinovirusuri, dar în special cu reactivitatea imunitară generală. Infecţiile cu rhinovirusuri exacerbează astmul.

Rinovirusurile produc 50% din totalul cazurilor de răceală comună. *Coronavirusurile* produc 20%, iar restul de 30% sunt cauzate de adenovirusuri, parainfluenza, RSV, influenza.

Epidemiologie. O caracteristică a rhinovirusurilor este specificitatea înaltă de gazdă. Ele se izolează cu cea mai mare frecvenţă de la persoanele care au suferit răceala comună. Cele peste 100 de serotipuri de rhinovirusuri s-au numerotat prin numărul antiserului specific neutralizant, într-un program sprijinit de OMS. Noile tipuri de rhinovirusuri emerg printr-un proces de mutaţie şi selecţie imunitară.

Serotipurile predominante se schimbă sezonier. Intre ele nu există reactivitate încrucişată: anticorpii specifici faţă de un serotip nu neutralizează celelalte serotipuri. Infecţia cu oricare din cele peste 100 de serotipuri poate produce răceala. Din această cauză, vaccinarea este ineficientă.

În climatul temperat sunt două perioade ale incidenţei maxime a a infecţiei cu rhinovirusuri: toamna şi primăvara. În sezonul rece, incidenţa infecţiei este scăzută. Sunt infectate persoanele din toate grupele de vârstă. Serotipurile prevalente variază de la un an la altul.

Imunitate. Infecţia cu un rhinovirus activează răspunsul imun humoral şi celular. IgG şi IgA serici încep să crească la o săptămână după inocularea voluntarilor şi ating valoarea maximă la o lună. Titrul IgG rămâne crescut un an, iar IgA scade lent. Creşterea lentă a titrului denotă că Ac nu sunt esenţiali pentru recuperare. Titrul mare al Ac este protector faţă de re-infecţia cu acelaşi serotip. Virusul este inactivat prin agregare, activarea C, blocarea legării de receptori. Factorul primar al rezistenţei la infecţia cu rhinovirusuri este sIgA, produsă de limfocitele B din submucoasă.

Eradicarea procesului infecţios este rezultatul activării IMC (Papadopoulos şi col., 2004). Spre deosebire de specificitatea înaltă a Ac, celulele T recunosc atât epitopii specifici, cât şi pe cei înrudiţi. In timpul infecţiei, numărul limfocitelor circulante scade, dar curând revine la normal şi poate să crească semnificativ (leucocitoză). Rhinovirusurile infectează, dar nu se multiplică în macrofagele căilor respiratorii.

Diagnosticul infecţiei cu rhinovirusuri se pune prin izolarea virusului pe un substrat celular, prin teste serologice sau prin detectarea acizilor nucleici. Rhinovirusurile se izolează din spălătura nazală sau din aspiratul nazal. Se multiplică în culturile de ţesuturi embrionare umane (H) sau de maimuţă (M). Nu se multiplică în organismul animal.

Cele mai bune substraturi sunt fibroblastele pulmonare umane şi tulpinile HeLa. Condiţiile optime pentru multiplicarea rhinovirusurilor includ o concentraţie de 0,35 g/l de bicarbonat, pH 7,0–7,2), t° = 33° şi o uşoară rotaţie a recipientului cu cultura celulară infectată, la 12 r/min. Culturile se examinează pentru ECP, detectabil la 24 ore, ce constă în contracţia, rotunjirea şi detaşarea celulelor de suport. Majoritatea probelor evidenţiază ECP la 8 zile. Pentru confirmarea identităţii se evaluează stabilitatea la pH acid şi neutralizarea cu antiser cu specificitate cunoscută. Metodele serologice se folosesc pentru detectarea Ac antivirali, dar răspunsul humoral este tardiv şi face ca aceste metode să nu fie utilizabile. În plus, datorită numărului mare de serotipuri (peste 100), testul neutralizării nu se utilizează în diagnosticul de rutină.

Reacția HAI se aplică pentru unele rhinovirusuri care aglutinează hematiile. ELISA este cea mai rapidă și mai sensibilă și are avantajul că diferențiază izotipurile de Ig din probă (ser, secreție nazală). Dar, ca și în cazul altor teste serologice, metoda este utilă pentru diagnostic numai când serotipul virusului este deja cunoscut.

Profilaxie și *terapie*. Nu există un preparat vaccinal datorită numărului mare de serotipuri față de care Ac sunt specifici și nu reacționează încrucișat.

Dintre agenții farmacologici antivirali, IFNα este cel mai folosit. Se administrează local (intranazal), înainte sau puțin după expunerea la virus. Nu s-a identificat nici un compus de sinteză care să inhibe infecția prin interferență cu dezvelirea sau cu alte etape ale multiplicării. Medicația antihistaminică are efecte favorabile ușoare.

Bibliografie

Blaine Hollinger F., Ticehurst J. 1990. Hepatitis A Virus, în vol. Virology, Second Edition, 1990, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Howard C. R., Zuckerman A. J. 1990. Viral Hepatitis, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Robertson B., Lemon S. 1998. Hepatitis A and E Viruses, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Rueckert R. R. 1990. *Picornaviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Rueckert R. R. 1996. *Picornaviridae:* The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Rueckert R. R.. 1990. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Couch R. B. 2001. Rhinoviruses, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York, 1990.

Rueckert R. R.. 2001. *Hepatitis A: Old and New* – Clin. Microbiol. Rev. 14, 38–58.

Nainan O. V., Xia G., Vaughan G., Margolis H.S. 2006. Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach. Clin. Microbiol. Rev. 19: 63–79.

Patick A. K., Potts K. E. 1998. Protease Inhibitors as Antiviral Agents. Clin. Microbiol. Rev. 11: 614–627.

Belsham G. J., Sonenberg N. 1996. RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. Microbiol. Rev. 60(3): 499–511.

Norkin L. 1995. Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and Design of Antiviral Agents. Clin. Micr. Reviews 8, 2: 293–315.

Papadopoulos N. G., Johnston S. L. 2004. Rhinoviruses, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.

Meng X. J. 2008. Hepatitis E Virus, în vol. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology, editors Mahy Brian W. J., Regenmortel Marc H. V. Academic Press.

Hyypia T. 2008. Echoviruses, în vol. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology, editors Mahy Brian W. J., Regenmortel Marc H. V. Academic Press.

21.6. Arbovirusuri. Familia Flaviviridae

Denumirea semnifică faptul că virusurile sunt menținute în natură, în primul rând sau într-o măsură importantă prin transmitere biologică între gazdele vertebrate sensibile, prin intermediul artropodelor (*ar-bo* = *ar*thropod *bo*rne). Prin definiție, arbovirusurile au cel puțin 2 gazde: *un vertebrat* la care produc viremie, ceea ce permite ca virusul să fie preluat de un *artropod hematofag*. Termenul *arbovirus* nu are semnificație taxonomică, deoarece include un grup heterogen de virusuri din 7 familii: *Toga-* (1 din 2 genuri), *Flavi-* (1 din 3 genuri), *Rhabdo-* (2 din 6 genuri), *Bunya-* (3 din 5 genuri), *Reo-* (2 din 12 genuri), *Orthomyxoviridae* (1 din 5 genuri), *Poxviridae* (virusul mixoma transmis de țânțar produce leziuni tegumentare la anumite genuri de *Leporidae*; virusul fibromului Shope, transmis de un artropod, produce papilomul Shope la iepurele de vizuină *Sylvilagus* în America de Nord). Catalogul internațional descrie 535 arbovirusuri, toate având genom ARN, cu excepția virusului febrei suine africane și a virusurilor *Pox* care au genom ADN.

S-au identificat numeroase artropode vectoare ale virusurilor infecțioase pentru animale și plante. Arbovirusurile se multiplică în organismul artropodelor într-un interval de 1–2 săptămâni fără

să producă leziuni, se disemineză şi infectează glandele salivare. Când artropodul se hrăneşte hematofag, virusurile sunt inoculate la gazda vertebrată, unde se multiplică şi produc viremie. Ciclul poate fi criptic, pentru că vertebratul face o infecţie inaparentă, dar în ciclul artropod-vertebrat, virusul este transmis accidental, la animale sensibile şi la om. In evoluţie, presiunea selectivă indusă de interacţiunea cu virusurile, diseminarea a fost favorizată de gazdele care fac viremie fără manifestări clinice. Pe de altă parte, mamiferele mici şi păsările sensibile pot face infecţii mortale, dar se înmulţesc suficient de repede pentru a genera indivizi sensibili şi astfel sunt populaţiile ideale pentru propagarea virusului. Animalele domestice sensibile sau care fac infecţie inaparentă fac legătura între ciclul natural şi cel uman. Omul se poate infecta prin contactul cu ţesuturile animale infectate, prin lapte sau prin vectorii infectaţi de la gazda vertebrată.

Numeroase virusuri infecţioase pentru vertebrate sunt transmise de artropode vectoare, fără să se multiplice în vector. Unele se transmit pe verticală, *transovarian,* în organismul ţânţarului *Phlebotomus* şi al căpuşii *Ixodes*.

Aproape toate infecţiile produse de arbovirusuri sunt *zoonoze*. Ciclul natural al transmiterii artropod-vertebrat rămâne nedectabil până când omul interferă cu ciclul natural.

Virusurile pot fi transmise la vertebrate care în mod obişnuit nu fac parte din ciclul natural. Unele arbovirusuri sunt transmise în ciclul om-artropod-om, produc viremie semnificativă la om şi determină epidemii. Majoritatea arbovirusurilor se găsesc în ţările tropicale (Africa şi America de sud).

Infecţiile cu arbovirusuri, la om, produc infecţii *febrile*, cu dureri de cap, mialgie, frisoane şi uneori cu stare generală foarte alterată. Pot produce *hemoragii* severe sau encefalită, cu sfârşit letal sau cu sechele neurologice permanente.

Infecţia are un parcurs bifazic: *febră uşoară-medie*, adeseori neobservată în stadiul viremic iniţial; *perioada de stare a encefalitei*, cu viremie ce poate fi mascată de RI. Numai o mică proporţie dintre cei infectaţi fac encefalita. Majoritatea fac numai faza iniţială a infecţiei, ce poate fi asimptomatică.

Infecţiile cu arbovirusuri, la om produc 3 tipuri de manifestări clinice:

- de cele mai multe ori, infecţiile sunt *febrile* nespecifice (pantomorfe);
- *infecţii neuromorfe* (encefalite) (virusul West Nile din regiunile temperate). Virusurile meningo-encefalitice au în comun proprietatea de *neuroinvazivitate*;
- *infecţii visceromorfe* (febre hemoragice). Unele arbovirusuri pot fi asociate cu mai multe entităţi clinice, în funcţie starea imunitară a gazdei şi de localizarea tisulară a infecţiei. Astfel, un arbovirus poate să producă o febră minoră la unii pacienţi, encefalită sau febră hemoragică la alţii.

Infecţiile cu arbovirusuri au distribuţie geografică localizată şi vectori distincţi. Fiecare continent tinde să aibă propriile arbovirusuri: virusul encefalitei equine venezuelene (vee), virusul encefalitei de vest (wee), de est (eee), al encefalitei japoneze etc. Arbovirusurile sunt denumite după procesul patologic pe care-l produc (febra galbenă, denga) sau după aria geografică în care au fost izolate iniţial (encefalita St. Louis, febra West Nile).

Familia Flaviviridae (flavus = galben) cuprinde peste 70 de virusuri, împărţite în 3 grupe pe baza modului de transmitere: circa jumătate sunt transmise de ţânţari; 11 sunt transmise de căpuşe, iar restul nu au vector cunoscut. Produc infecţii clinice şi uneori letale la om şi animale: g. *Flavivirus*, g. *Pestivirus*, *virusul hepatitei C*.

În natură infecţia se propagă alternativ între vertebrate (mamifere, păsări) şi vectori (ţânţari, căpuşe). Omul este infectat accidental, când intră în ecosisteme noi, dar nu are semnificaţie pentru ciclul propagării.

Cele 3 virusuri au proprietăţi biologice distincte şi nu manifestă reactivitate serologică încrucişată, dar sunt asemănătoare morfologic, ca organizare genomică şi în privinţa mecanismului replicării ARN genomic. Sunt agenţi cauzali ai multor maladii infecţioase umane, în special *encefalite*.

Structură. Virionul are diametrul cuprins între 37–50 nm şi o simetrie icozaedrică. Genomul este o moleculă de ARN mc de polaritate pozitivă, de 11 kb lungime. Învelişul conţine 2 proteine: M (membrane) şi E (envelope).

Multiplicarea are loc în citoplasmă. Receptorii celulari pentru aceste virusuri nu se cunosc, dar s-a observat înglobarea specifică a virionilor cuplaţi cu Ac specifici, în macrofagele cultivate.

Randamentul multiplicării flavivrusurilor poate să crească de 20–1000 de ori, dacă virionii au fost puşi în contact cu anticorpii specifici la un titru subneutralizant. Macrofagele au receptori pentru Fc. Acesta este fenomenul de *enhancement imun*, dependent de existenţa receptorilor pentru Fc pe celulele sensibile şi nu este strict specific flavivirusurilor.

ARN genomic este tradus ca un mesaj unitar. Toate proteinele virale rezultă prin prelucrare co- şi post-traducere. ARN infecţios are rol de matriţă pentru sinteza unei catene complementare negative. Ulterior catenele multiple anticomplementare au rol de matriţe pentru sinteza catenelor de lungimea genomului.

În celulele infectate s-a identificat numai ARNm de lungimea ARN genomic.

Virionul encefalitei japoneze (VEJ) conţine 3 proteine structurale: C, M, E. In celula gazdă virusul codifică sinteza altor 7 proteine nestructurale: NS_1, NS_{2A}, NS_{2B}, NS_3, NS_{4A}, NS_{4B}, NS_5. Virionii se asamblează înmugurind prin membranele reg, în veziculele citoplasmatice. Virionii imaturi conţin proteina precursoare M (prM) şi sunt transportaţi prin sistemele membranare ale căii secretorii, la suprafaţa celulei, unde are loc exocitoza. Curând după eliberarea din celulă, prM este clivată de furină (o protează) şi rezultă virioni maturi care conţin proteina M. În timpul multiplicării virusului, sinteza macromoleculelor celulare continuă până în stadiul tardiv când ECP devine evident.

VEJ infectează numeroase specii de vertebrate. Este letal pentru puii nou născuţi de şobolan, indiferent de calea de inoculare. Neuroinvazivitatea scade odată cu vârsta şi adulţii sunt sensibili numai după inoculare intracerebrală. Şoarecele rămâne sensibil la infecţia encefalitică la orice vârstă. La primate, după inoculare intracerebrală, virusul provoacă o infecţie letală, iar inocularea periferică produce numai o infecţie asimptomatică.

Calul şi omul fac encefalite. Virusul transmis prin înţepătura ţânţarului se multiplică, probabil în limfocitele ganglionare şi are o fază viremică înainte de a invada SNC. Nu se cunoaşte mecanismul prin care virusul traversează bariera sânge-creier.

Patologie. Flavivirusurile pot produce infecţii, de la cele asimptomatice sau febrile, cu erupţie eritematoasă sau artralgie sau ambele, până la febre hemoragice, hepatite şi encefalite letale. Manifestările clinice reflectă tropismul virusurilor pentru diferite organe ţintă. Cele mai reprezentative sunt febra galbenă, encefalita japoneză, encefalita St. Louis.

Febra galbenă este tipică pentru flavivirusurile transmise de ţânţari (*Aedes aegypti*) şi căpuşe. Infecţiile transmise de ţânţari sunt mai comune la tropice, iar cele transmise de căpuşe prevalează în regiunile temperate.

Febra galbenă este produsă de un *flavivirus viscerotrop* şi variază în ceea ce priveşte intensitatea manifestărilor clinice, de la infecţia inaparentă, până la evoluţia fulminantă în 3 zile. Perioada de incubaţie este de 3–6 zile. Faza iniţială se caracterizează prin viremie şi virusul este preluat de ţânţari. În cazurile severe, manifestările acute timpurii nespecifice (dureri de cap, musculare, friguri, stare de rău general) sunt urmate de o scurtă perioadă de remisie, urmată de atacul hemoragic hepatic cu icter şi infecţia rinichiului. La pacienţii alcoolici, mortalitatea este de 20–50%.

Prin pasaje repetate s-a obţinut o mutantă cu virulenţă atenuată, utilizabilă ca *vaccin* protector faţă de infecţia cu virusul febrei galbene. Sunt modificate proteinele de înveliş, ceea ce diminuează eficienţa legării virusului de receptorii celulari, atenuează tropismul şi reduce virulenţa.

Virusul Denga este clasificat în familia *Flaviviridae*, deoarece este asemănător virusului febrei galbene. Genomul ARN monocatenar de polaritate pozitivă are un ORF de 10 233 nucleotide, ce codifică un polipeptid de 3 411 aminoacizi. Regiunea necodificatoare la capătul 5' are 18 nucleotide, urmată de primul codon AUG la care este iniţiată traducerea. Secvenţa necodificatoare este mai scurtă decât secvenţa omologă a picorna-, la care traducerea nu începe la primul codon AUG.

În structura virionului se găsesc 3 proteine: C (core); M (proteina asociată peplosului); E (de înveliş). Virusul imatur conţine proteina precursoare-M. Genele ce codifică proteinele structurale sunt localizate la capătul 5' şi cuprind mai mult de ¼ din totalul genelor. Ordinea genelor în molecula de ARN este C – preM (M) – E.

Proteina C este bazică, fiind bogată în lizină şi arginină şi interacţionează cu ARN. Nu are secvenţă hidrofobă, ceea ce sugerează că se sintetizează pe ribosomii liberi. Glicoproteina E este un homotrimer, localizat pe suprafaţa virionului matur.

Proteinele nestructurale (NS) s-au identificat şi cartat pe genomul ARN prin secvenţierea limitată a aminoacizilor C- şi N-terminali. Ordinea proteinelor NS, după gena proteinei E, este NS_1, NS_{2a}, NS_{2b} (ambele codificate de gena NS_2), NS_3, NS_{4a}, NS_{4b} (codificate de gena NS_4) şi NS_5. NS_3 ar fi o protează virală cu rol în prelucrarea poliproteinei, ar fi o componentă a ARN-polimerazei virale sau ar îndeplini ambele funcţii enzimatice. Proteinele NS_4 au funcţii necunoscute.

S-au descris 4 variante antigenice (serotipuri): DENV-1; -2; -3; -4.

Ciclul de multiplicare. Virusul pătrunde în celulă prin fuziune şi eliberează nucleocapsida în citoplasmă sau membrana plasmatică se intruzează şi formează o veziculă de endocitoză (endosom) în jurul virionului învelit. In condiţiile unui pH acid, peplosul viral fuzionează cu membrana endosomului şi eliberează nucleocapsida în citoplasmă.

Replicarea ARN. Din celulele infectate cu virusul Denga, în gradient de sucroză s-au izolat 3 forme de ARN:

- ARN 20–22 S, rezistent la RN-ază (forma de replicare, formată din cele 2 catene de polaritate opusă);
- ARN heterodispers 20–28 S, parţial rezistent la RN-ază (intermediarul de replicare, parţial dublu catenar);
- ARN 42 S, sensibil la RN-ază.

Forma de replicare poate fi convertită la ARN 42 S sub acţiunea factorilor denaturanţi (căldura), iar intermediarul de replicare este convertit la ARN 42 S şi variate fragmente mai mici.

Asamblarea parcurge următoarele faze:

- asamblarea nucleocapsidei din proteina C şi ARN;
- înmugurirea nucleocapsidei prin membranele ce conţin proteinele E şi M;
- eliberarea din celulă prin înmugurire sau prin vezicule de endocitoză;
- clivarea proteinei M, ceea ce duce la reorganizarea suprafeţei şi maturarea virionului.

Spre deosebire de alfavirusuri care se maturează prin înmugurire la nivelul membranei citoplasmatice, flavivirusurile se învelesc la nivelul cisternelor reg şi în cisternele Golgi. S-au identificat 4 serotipuri ale virusului, fiecare cu numeroase variante genomice.

Epidemiologie. Ţânţarii (*Aedes aegypti, A. albopictus*) sunt singurele gazde naturale ale virusului Denga. Infecţia este transmisă prin înţepătura insectei infectate. In condiţii naturale, virusul produce îmbolnăviri numai la om. Oricare dintre cele 4 serotipuri produce o stare viremică, cu durata medie de 4–5 zile. In faza viremică, virusul este ingerat de ţânţar şi infectează celulele intestinului mijlociu. După 8–12 zile, virusul infectează glandele salivare ale insectei, de unde, la o nouă hrănire, este transmis la om.

ECP. Virusul Denga se cultivă pe celulele mamaliene şi de insecte. Infecţia celulelor nu blochează biosinteza proteinelor celulare. ECP constă în creşterea refractilităţii, rotunjirea şi chiar fuziunea celulelor.

Patologie. Infecţia este caracterizată prin erupţie eritematoasă tegumentară, asociată cu creşterea volumului celulelor endoteliale ale vaselor mici, edem perivascular şi infiltrarea celulelor mononucleare, dar în celulele epidermei nu s-au identificat virioni şi nici antigene virale. Patogenitatea este amplificată de fenomenul de enhancement imun: Ac ne-neutralizanţi formează complexe cu virionii şi stimulează infecţia fagocitelor mononucleare prin intermediul receptorilor pentru regiunea Fcγ. După infecţie, acestea eliberează mediatorii vasoactivi ce produc creşterea permeabilităţii vasculare. Pierderea plasmei poate fi medie şi tranzitorie (DHF = Dengue hemoragic fever) sau severă şi prelungită, urmată de şocul hipovolemic şi moarte (DSS =Dengue shock syndrome). DSS este mai comună la infecţia secundară, dar apare şi după infecţia primară, ceea ce sugerează că Ac subneutralizanţi omologi, induşi de infecţia primară sau alţi factori imunitari pot produce fenomenul de enhancement imun.

Diagnosticul infecţiei se face prin izolarea virusului infecţios sau prin izolarea anticorpilor specifici.

Non-arbovirusurile grupate în g. *Flavivirus* se găsesc fie la artropode, fie la vertebrate, dar nu la ambele şi au importanţă medicală redusă; g. *Pestivirus*; *Arterivirus* (virusul arteritei equine) şi *LDH* (virusul lactic dehidrogenazei).

Pestivirus, virusul infecţios al mucoaselor, nu infectează omul, dar are importanţă medicală veterinară.

Virionii au diametrul de 60 nm, sunt sferici, înveliţi şi au o regiune centrală electrono-densă. Pe suprafaţa virionului proemină trei tipuri de glicoproteine, asociate prin punţi S-S ca homo- sau heterodimeri.

Virionii îşi pierd infecţiozitatea prin încălzire la 56° pentru 30 min., prin tratamentul cu solvenţi organici şi detergenţi. Îşi păstrează infecţiozitatea la un spectru larg de variaţie a pH.

Genul *Pestivirus* include 4 entităţi infecţioase:

- virusul febrei suine clasice (CSFV);
- virusurile diareei bovine 1 şi 2 (BVDV);
- virusul border (BDV), descoperit în 1959 în zona de graniţă a Angliei şi Ţării Galilor ca infecţie congenitală a oilor şi caprinelor.

Gazdele sensibile la infecţia cu *Pestivirus* sunt mamiferele artiodactile (rumegătoare cu copita despicată şi porcul). La bovine şi ovine, BVDV produce frecvent infecţii persistente, cu rol de rezervor pentru menţinerea virusului. Virusul este transmis de la animalele viremice asimptomatice, la cele neinfectate. Virusul pătrunde pe cale nazală sau orofaringiană, cel mai adesea, prin contact direct, favorizat de aglomerările de animale sau de practica marcării.

Infecţia persistentă se produce după ce virusul traversează placenta şi infectează fătul în perioada timpurie a dezvoltării. Infecţia intrauterină induce starea de toleranţă şi astfel animalele infectate persistent elimină continuu cantităţi mari de virus, dar sunt negative pentru anticorpii specifici. Ele pot face o boală fatală a mucoaselor, cu diaree sanguinolentă datorită ulcerării extensive a tractului gastrointestinal.

CSFV produce *holera porcului*, o infecţie gravă, foarte contagioasă, care produce pierderi economice în toată lumea. In Europa infecţia a fost eradicată, dar virusul este reintrodus periodic, prin importul de carne. Transmiterea se face predominant pe orizontală, prin contact direct şi prin fecale, urină, secreţii nazale, dar virusul se poate transmite vertical, prin celulele germinale infectate persistent. Holera porcului este o infecţie acută cu mortalitate semnificativă. Cele mai frecvente infecţii sunt cele cronice cu manifestări clinice medii şi cele persistente consecutive infecţiei intrauterine. Transmiterea intrauterină poate duce la moartea fătului sau la infecţia clinică letală a nou-născuţilor.

Virusul-se multiplică în celulele epiteliale ale tractului digestiv, în celulele endoteliale ale vaselor sanguine şi limfatice, în celulele limfoide, în macrofage.

Virusul rubella la om, BVDV şi BDV la rumegătoare pot produce infecţii *inaparente*. Infecţia în primele 3 luni de gestaţie, la bovine şi ovine, cu tulpini virale necitopatice (ncp), duce cel mai adesea la moartea fătului sau animalele nou născute sunt aparent normale, purtătoare de virus, dar negative pentru anticorpi. Infecţia timpurie, în timpul diversificării repertoriului receptorilor de Ag ai limfocitelor, induce starea de *toleranţă* şi animalele rămân infectate persistent toată viaţa. Animalele pozitive pentru virus, dar negative pentru Ac, reprezintă un rezervor important de virus infecţios. Suprainfecţia animalelor tolerante cu o tulpină mai virulentă, citopatică, produce o infecţie fulminantă şi animalele mor datorită unui sindrom al bolii mucoaselor, asociat cu distrugerea epiteliului intestinal, leziuni inflamatorii ale tractului alimentar şi depleţia ţesutului limfoid din plăcile Peyer.

Tulpinile ncp şi cp sunt foarte înrudite antigenic. Cele ncp rezultă prin evenimente mutaţionale din cele cp.

In vitro se multiplică puţin şi se purifică greu pentru că se eliberează ineficient din celulele infectate, fiind asociate cu resturile celulare.

Virusul hepatitei C (g. *Hepacivirus*)

Virionii înveliţi, cu aspect sferic şi simetrie icozaedrică, s-au izolat din plasma umană. Cantitatea de preparat obţinută din infecţiile *in vivo* sau *in vitro* este foarte mică, ceea ce îngreunează studiile structurale şi biochimice.

Virionii se găsesc sub 2 forme structurale:

– *virioni compleți*, cu un înveliș lipidic derivat din membranele celulei în care sunt inclavate glpr E_1 și E_2, proeminente la suprafață (diam. 55 nm) (fig. 402). Existența învelișului este sugerată de sensibilitatea la cloroform: preparatul viral își pierde infecțiozitatea;
– nucleocapside nude, fără înveliș (33 nm. diam.).

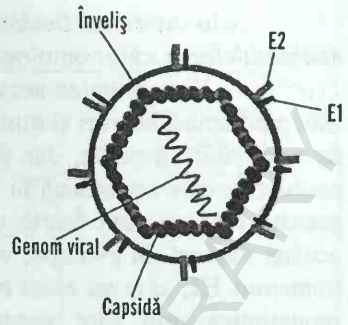


Fig. 402. Componentele structurale ale VHC.

Virionii se asociază cu *β-lipoproteinele* serice și cu Ac formând complexe neinfecțioase mai ușoare și respectiv, mai dense.

Genomul este o moleculă de ARN mc de *polaritate pozitivă*, asemănătoare pesti- și flavivirusurilor, de circa 9400 nt, căreia îi lipsește secvența poli-A-3', dar infecțiozitatea sa nu s-a demonstrat (fig. 403).

Informația genetică este organizată *într-un singur cadru de citire* (ORF) și se sintetizează o *poliproteină* de circa 3000 de aminoacizi. Clivajul poliproteinei generează proteinele structurale și proteine NS. La capetele 5' și 3' sunt secvențe simetrice netraduse (ntr), iar ORF cuprinde peste 95% din secvența genomică.

Proteinele structurale C, E1 și E2 sunt codificate de pătrimea 5' a genomului, iar proteinele NS (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a și NS5b), de restul moleculei.

Genomul izolat a fost transcris în ADNc și folosind sisteme de expresie *in vitro* și *in vivo* s-au identificat proteinele codificate. Majoritatea sunt *nestructurale* (NS). Concluzia a rezultat din analiza comparativă a proteinelor din preparatul viral și din celulele infectate.

Codon inițiator

5'---------- AUG H_2N - C - $E_1 - E_2$/NS1 – NS2 - NS3 - NS4 – NS5 - COOH ----------UUUUU- 3'

ntr (341 nt) Core Env 4a 4b 5a 5b (polimerază) ntr (27-66 nt)

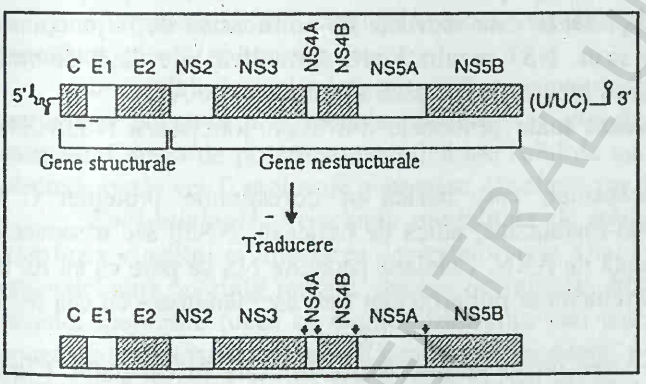


Fig. 403. Organizarea genomului HCV. Regiunea codificatoare este flancată de secvențele netraduse 5' și 3'. Genomul este tradus într-o poliproteină ce conține atât proteinele structurale (C, E_1 și E_2), cât și nestructurale (NS_2–NS_{5B}). Săgețile indică situsurile la care clivează proteaza NS_3 (după A. K. Patick and K. E. Potts, 1998).

Secvența de la capătul 5' codifică proteinele structurale (S) și este cea mai bine conservată la toate variantele genetice izolate de VHC. Secvența ntr 3' este scurtă, fiind urmată, la cele mai multe izolate, de poli UUU (pentru că *in vitro* se leagă cu oligo dT celuloză) și codifică proteinele nestructurale.

Primul produs al poliproteinei este proteina C (neglicozilată) a capsidei, care se complexează cu ARN și formează nucleocapsida. Următoarele două proteine (E1 și E2) sunt inclavate în peplos.

Variantele genomice. Analiza comparativă a secvențelor genomice de la diferite izolate din întreaga lume, arată că VHC este foarte *heterogen*.

S-au delimitat *6 genotipuri majore de VHC și peste 100 de variante genomice și antigenice.* Intre cele 6 genotipuri majore este o omologie a secvenței de 70–80%. La izolatele celor 6 genotipuri, secvența 5' ntr este cea mai bine conservată (omologia fiind de circa 90%), regiunea 3' este relativ bine conservată, având o omologie de 81–88%. Alte regiuni genomice au un grad superior de diversitate. Regiunea E1 și NS5 sunt cele mai variabile.

În interiorul fiecăruia dintre cele 6 genotipuri s-au identificat variante genetice – *subtipuri* notate *a, b, c*. În total sunt mai mult *de 12 subtipuri*. Secvența nucleotidelor diferitelor subtipuri are un grad de asemănare de 89–93%.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In interiorul fiecărui subtip sunt alte *variante genetice*, cu o variație *mai limitată a secvenței nucleotidelor*, a căror omologie se situează între 94–99% pentru regiunea C, E1 și NS5.

Variabilitatea secvenței de nucleotide se datorază faptului că replicarea genomului HCV este predispusă la erori și mutațiile generează în organismul infectat, o populație de virioni cu secvențe de nucleotide înrudite, dar diferite, fenomen denumit 'efect de quasispecie*. Variația secvenței de nucleotide este accentuată în regiunea genomică ce codifică regiunea N-terminală a E2. Secvențele în această regiune sunt foarte variabile la izolatele individuale, dar și între izolatele succesive de la același pacient. In evoluție, variația nucleotidelor a fost generată de Ac neutralizanți specifici față de domeniul E2, care au creat o presiune selectivă permanentă. Variația antigenică a proteinei E2 este modalitatea prin care virusul evită efectul neutralizant al Ac. Ca dovadă, variația secvenței codificatoare a proteinei E2 este mult mai redusă la pacienții agamaglobulinemici.

* In general, *genomul ribovirusurilor* are dimensiuni reduse, iar rata de mutație/nucleotid/tur de replicare este maximă, fapt care permite o rată de evoluție genetică de milioane de ori mai rapidă decât a gazdelor lor. Supuse permanent presiunii selective a factorilor de apărare a gazdei, evoluția virusurilor este exclusiv *adaptativă*. Ratele foarte înalte de mutație, generează așa numitele "mutante de roire" sau populații de *quasispecii* de virusuri, care conferă o mare adaptabilitate multiplicării virale, menită să compenseze șansa minimă a interacțiunii cu substratul permisiv. Quasispeciile de virusuri ARN se adaptează la un prag de erori mutaționale, compatibil cu multiplicarea. Virusurile se multiplică la limita superioară a mutabilității și adaptabilității. Datorită ratei înalte a mutației, clonele de ribovirusuri și retravirusuri sunt quasispecii sau "mutante roitoare", care prezintă variații genetice genomice.

Mutabilitatea accentuată se datorează naturii intrinseci a funcției ARN-polimerazei virale, predispusă la erori ("error prone"), ca o consecință a absenței funcției de corectare ("proof reading"), în timp ce majoritatea ADN-polimerazelor virale își corectează erorile proprii.

Diversitatea genomică are câteva consecințe:
- severitatea infecției poate să depindă de genotip;
- diferitele genotipuri răspund diferit la tratamentul cu IFN;
- eficiența vaccinului este anulată de evoluția mutantelor care scapă acțiunii neutralizante a Ac.

Proteinele. Regiunea NS a genomului codifică proteinele NS2–NS5. Clivarea poliproteinei este catalizată de proteaze virale. Una dintre proteaze este secvența de aminoacizi de la joncțiunea NS2-NS3, cu funcție autocatalitică a acestui situs. NS3 rezultată prin autoclivaj are două domenii funcționale: unul cu funcție de protează și unul cu funcție de helicază a moleculei de ARN.

NS3 este o *serin-protează*, care clivează toate proteinele din aval: joncțiunea NS3/NS4a, NS4a/NS4b, NS4b/NS5a, NS5a/NS5b.

Proteina C, componentă a nucleocapsidei, este bazică și corespunde proteinei C a flavivirusurilor. NS3 are și activitate nucleotid-fosfatazică, adică de helicază. NS5b are o secvență terminală specifică ARN-polimerazei dependentă de ARN. Celelalte proteine NS se pare că au rol în multiplicarea și asamblarea virusului în RE. Prelucrarea poliproteinei este asemănătoare cu cea de la alte flavi- și pestivirusuri.

Multiplicarea. VHC se multiplică *in vitro* într-o măsură foarte limitată în cel puțin 2 linii celulare T umane, cu ECP minim, greu detectabil, iar cantitatea de virus eliberat din celule este mică. Evidențierea multiplicării este detectabilă prin metode sensibile (RT-PCR). În 2005, s-a izolat o tulpină virală (JFH-1 –Japanese fulminant hepatitis) care se multiplică cu un randament foarte bun într-o tulpină de hepatocarcinom uman (Huh-7) (Bartenschlager, 2008).

Pătrunderea virusului în celulă este mediată de molecule receptoare neidentificate.Virionii sunt înglobați prin endocitoză mediată de clatrină. Ulterior, peplosul fuzionează cu membrana endosomului acid și genomul este eliberat în citoplasmă. ARN de polaritate pozitivă este tradus pe reg, dependentă de secvența IRES (internal ribosomal entry site). Se sintetizează o poliproteină clivată de semnal-peptidazele celulei și de proteazele virale. După clivaj se formează un complex de replicare, asociat cu membranele, format din ARN viral, proteine virale și factori celulari. Catenele de polaritate negativă au rol de matriță pentru sinteza ARN de polaritate pozitivă cu funcție de mesager. După sinteza proteinelor, moleculele de ARN de polaritate pozitivă se asociază cu proteina C și formează nucleocapsidele virale. Proteinele E rămân inserate în membranele reg. Nucleocapsidele se învelesc prin înmugurire în lumenul reg. Particulele virale sunt transportate pe calea secretorie a cisternelor Golgi. Veziculele de transport fuzionează cu membrana citoplasmatică și virionii sunt eliberați.

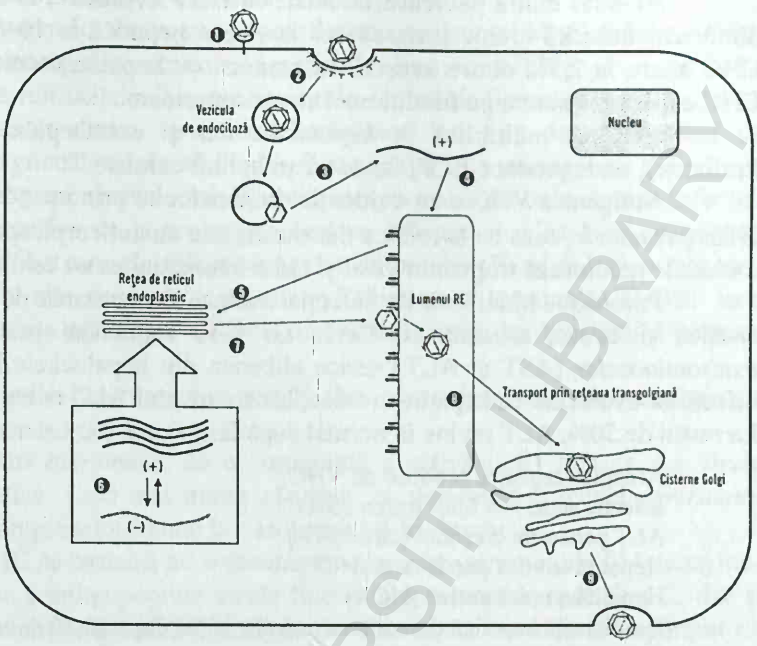


Fig. 404. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a VHC. 1. VHC se leagă de un receptor membranar (glicozaminoglicani sau receptorul pentru LDL), cu rolul de liganzi virali. 2. Virusul este înglobat în vezicule de endocitoză tapetate cu clatrină. 3. După ce peplosul fuzionează cu membrana veziculei de endocitoză în mediul acid al endosomului, capsida se dezagregă şi genomul este eliberat în citoplasmă. 4. Genomul ARN este tradus la nivelul cisternelor reg. 5. La locul multiplicării, cisternele reg se organizează într-o reţea compactă. 6. In reţeaua membranară are loc transcrierea ARN genomic de polaritate pozitivă, de pe matriţa de polaritate negativă. Noile catene de polaritate pozitivă sunt traduse în proteine, sunt utilizate pentru replicarea ARN sau se împachetează în noile capside. 7. Asamblarea are loc în cisternele reg, unde sunt inserate proteinele peplosului. Se crede că virionii înmuguresc în lumenul reg. Virionii progeni sunt exportaţi pe calea de secreţie a cisternelor golgiene (8) şi sunt eliberaţi (9) după ce veziculele de transport fuzionează cu membrana plasmatică.

In vivo, cantitatea de virus produsă de celulele infectate este mult mai mare, ceea ce reflectă existenţa unor deosebiri majore ale mediului celular *in vitro* şi *in vivo*. Multiplicarea *in vivo* este stimulată de un set de citokine şi factori de creştere, care se găsesc în ficat, dar lipsesc *in vitro*.

Cimpanzeul este singurul model experimental pentru infecţia cu VHC. Inocularea iv reproduce infecţia şi hepatita acută.

În celulele *hepatice* infectate şi în *mononuclearele* periferice s-au detectat catene de polaritate pozitivă şi negativă prin metoda hibridării *in situ*. Se pare că nu există forme de replicare dublu catenare. Catena de polaritate negativă are rolul de matriţă pentru sinteza noilor catene de polaritate pozitivă: unele vor fi molecule genomice, iar altele vor fi traduse în proteine.

Epidemiologie. Principala modalitate de transmitere a VHC (90%) este cea *parenterală*: transfuzia sângelui şi injectarea derivatelor sale. Omul este singura gazdă a virusului. Unele profesii (stomatologii) prezintă un risc crescut de infecţie. Mai rar VHC se transmite pe *cale sexuală* prin lichidul spermatic (ceea ce explică frecvenţa mai mare a infecţiei la prostituate şi homosexuali) şi congenitală (transplacentară). Riscul infecţiei creşte pentru cei care se tatuează, pentru cei care-şi injectează iv droguri cu ace infectate şi pentru cei care fac dializă renală. Infecţia post-transfuzională cu VHC are o evoluţie mai agresivă decât cea dobândită prin injectarea iv a drogurilor, probabil datorită dozei de virus inoculat. Transplantul de organe de la donorii infectaţi cu VHC poate transmite infecţia, dar corneea (avasculară) nu poate transmite VHC.

Majoritatea infecţiilor acute cu VHC sunt subclinice. Circa 30% din numărul infecţiilor sunt asociate cu simptome nespecifice: durere abdominală, inapetenţă, stare de oboseală şi de rău general.

Perioada de incubaţie a infecţiei cu VHC este de 15–75 de zile, interval în care ARN devine detectabil în ser prin RT-PCR. Titrul viral atinge 10^5–10^7 molecule genomice/ml între 6–10 săptămâni.

Faza acută a infecţiei, cu viremie, poate să se manifeste mai devreme, dar testele disfuncţiei hepatice devin anormale după acest interval. Creşte nivelul aminotransferazelor, datorită eliberării lor din hepatocitele lezate, la 5–10 săptămâni post-infecţie. Creşterea ALT este asociată cu prezenţa ARN viral în plasmă, iar normalizarea valorilor ALT, se corelează cu dispariţia ARN. Faza acută a infecţiei poate dura 2–4 luni, *cu viremie*. Rareori produce hepatită acută (7/100 000 cazuri). Infecţia este complicată de alcoolism şi de infecţia cu alte virusuri hepatitice.

Infecţia progresează lent, este asimptomatică până la decompensarea ficatului şi produce chiar CHC.

50–80% dintre pacienţii infectaţi cu HCV evoluează la starea de purtător cronic. Circa 30% dintre cei infectaţi cronic progresează la ciroză hepatică în 10–30 de ani după infecţie primară, iar CHC apare la 2,5% dintre aceştia. În contrast cu hepatita cronică B, la pacienţii infectaţi cu VHC, CHC evoluează numai pe fondul unei ciroze anterioare.

VHC se multiplică în *hepatocite*, dar şi extrahepatic (în macrofage şi posibil chiar în limfocite), unde produce ECP, iar *in vitro*, în linii celulare T.

Antigenele VHC s-au evidenţiat în hepatocite prin metoda IF. In sânge virionii se asociază cu *β-lipoproteinele*, ceea ce le reduce densitatea, sau cu anticorpii specifici şi densitatea lor creşte. Aceste molecule modulează tropismul viral şi chiar interacţiunea cu celulele.

Patologie. Manifestările infecţiei variază de la starea de purtător inaparent, până la hepatita cronică şi ciroză, asociată cu CHC. La 5–10 săptămâni post-infecţie începe să crească nivelul *transaminazelor* (AST şi ALT) serice eliberate din hepatocitele lezate. Mai mult de 50% din totalul infecţiilor evoluează ca hepatite cronice, la care nivelul ALT serice oscilează şi pacienţii rămân viremici. La restul de 50%, ALT revine la normal după faza acută, dar cei mai mulţi pacienţi rămân viremici.

Afecţiuni hepatice produse de VHC
Infecţie acută ---- Icter (circa 25%)
ALT persistent crescută (circa 50%)
Hepatită cronică persistentă (HCP)
Hepatită cronică activă (HCA)
Insuficienţă hepatică datorată cirozei (10-20%) după 20-30 de ani şi CHC primar după alţi 10 ani.

Histologic, hepatita C este asociată cu:
- apariţia foliculilor limfoizi în spaţiile portale;
- infiltrat al celulelor inflamatorii în sinusoidele lobulare;
- depozite lipidice mari în hepatocite (steatoză);
- necroza hepatocitelor şi fibroză (depozite de colagen) cu grade diferite.

Pacienţii cu *hepatită C cronică*, pe baza nivelului ALT crescut, cu sau fără simptome clinice au *hepatită cronică persistentă*, cu titru viral mic şi valori moderat crescute ale transaminazelor (TA), sau *hepatită cronică activă* cu titru viral crescut şi valori ridicate ale *transaminazelor*, cu sau fără ciroză. Ciroza apare la 20% dintre cazuri şi duce la insuficienţă hepatică la circa 20–25% dintre cazurile cirotice.

Ţesutul hepatic este infiltrat cu limfocite TCD_4 şi TCD_8. Leziunile hepatice se datorează, cel puţin parţial, răspunsului imun, dar ECP direct datorat multiplicării HCV poate fi un factor important al patologiei, un semnal pentru infiltrarea şi recrutarea limfocitelor specifice în ficat.

Altă consecinţă a infecţiei cu VHC este CHC (carcinomul hepatocelular). Progresia de la hepatita cronică activă la ciroză şi eventual la CHC este lentă, cu un interval mediu între infecţie şi declanşarea cirozei şi CHC de 21 şi respectiv 29 de ani.

Răspunsul imun este humoral şi celular. Imunitatea înnăscută este conferită de IFNα. In serul pacienţilor s-a evidenţiat prezenţa Ac care *in vitro* inhibă multiplicarea virusului. Probabil au efect neutralizant şi *in vivo*. Sub acţiunea presiunii selective, în timp, apar noi variante genetice rezistente la acţiunea neutralizantă a Ac*.

* La un pacient agamaglobulinemic, secvenţele hipervariabile ale genomului VHC au rămas neschimbate timp de 2–5 ani, ceea ce sugerează că noile variante genetice şi antigenice apar ca rezultat al presiunii selective a RI.

Infecţia acută cu VHC este controlată de RIMC specific faţă de antigenele VHC. Limfocitele TCD_4 şi TCD_8 se activează policlonal şi recunosc epitopi asociaţi cu moleculele CMH II şi respectiv CMH I. La pacienţii cu infecţie cronică, răspunsul IMC este oligoclonal. Limfocitele Tc recunosc epitopii proteinei C şi ai proteinelor E_1 şi E_2.

Infecţia cu VHC este *persistentă de tip cronic* (productivă). Problemele majore ale patologiei VHC sunt *persistenţa infecţiei şi sensibilitatea la reinfecţie*, generate de mai multe cauze:

– RIMH faţă de proteinele învelişului viral este *ineficient*. Proteinele C şi NS_3 sunt foarte antigenice şi activează ambele compartimente ale RI. Dar RI nu este suficient de protector din mai multe cauze:

– rata de multiplicare a virusului depăşeşte capacitatea de răspuns imun;
– prezentarea neadecvată a antigenelor virale, ce se poate datora interferenței VHC cu funcția CD;
– deleția celulelor TCD_4 sau anergia lor, devenind incapabile să producă IFNγ;
– VHC favorizează apoptoza limfocitelor Tc specific virale, indusă de ligandul Fas (CD_{95});
– Ac nu neutralizează infecțiozitatea virionilor. Ineficiența lor s-ar datora faptului că glicoproteinele de înveliş sunt foarte *glicozilate* şi astfel epitopii antigenici sunt mascați;
– apariția *noilor variante antigenice* este decisivă pentru incapacitatea RI de a elimina infecția. Izolatele de virus, chiar a celor succesive de la acelaşi pacient cu infecție cronică au o accentuată variabilitate antigenică. Genele codificatoare ale glicoproteinelor de înveliş (E_1 şi E_2) au o rată mai mare de variație mutațională decât alte secvențe genomice. Regiunea N-terminală E2/NS1 este hipervariabilă. Glicoproteinele sunt ținta principală a RIMH, dar variabilitatea lor biochimică permite evitarea acțiunii Ac.

Clinic, schimbările în regiunile hipervariabile pot fi fără consecințe sau sunt asociate cu episoade distincte de hepatită.

VHC declanşează manifestări *autoimune*, ca o consecință a activării RI față de Ag virale expuse pe suprafața celulelor hepatice. Cele mai multe afecțiuni se datorează infecției *persistente cronice*, cu formarea şi depunerea complexelor imune în vasele mici şi în rinichi.

Diagnosticul infecției cu VHC se bazează pe *evidențierea Ac serici* prin metoda EIA (enzyme-linked immunosorbent assay). Trusa conține peptide virale lineare recombinante (proteina C, dar şi NS_3, NS_4 şi NS_5) codificate de secvențele genice, sintetizate de levuri. S-a considerat important ca kiturile să conțină mai multe antigene pentru detectarea Ac serici, deoarece există diferențe de reactivitate imunitară a pacienților față de diferite proteine ale VHC. Trusele cu Ag multiple au crescut eficiența diagnosticului pentru detectarea seroconversiei timpurii. Intervalul seroconversiei este variabil: între 7–31 săptămâni după infecția prin transfuzie. Performanțele truselor de diagnostic au evoluat şi au atins eficiența de aproape 100%. Testarea donorilor de sânge a evidențiat o rată a infecției de 0,2–0,5 în Europa de nord şi de 1,2–1,5% în sudul Europei şi Japoniei. Mulți dintre cei pozitivi au antecedente de risc al transmiterii parenterale: transfuzie, primitori de produse derivate din sânge, injectarea iv a drogurilor.

VHC produce viremie, dar pentru că virusul seric are un titru scăzut, nu s-a elaborat o metodă directă pentru evidențierea Ag virale. Viremia se monitorizează cu un grad înalt de sensibilitate, prin tehnica PCR a ADNc pentru detectarea ARN viral. Capătul 5' al ARN genomic al VHC este ideal pentru RT-PCR, deoarece este bine conservat la diferitele izolate virale. Se folosesc primeri oligonucleotidici cu secvență conservată, urmată de hibridarea cu o probă marcată. Metoda detectează ARN la nivelul câtorva zeci de copii/ml ser. Astfel, viremia se detectează la numai câteva zile după infecție.

Terapia VHC se bazează pe administrarea sistemică a IFNα recombinant. Sterilizarea organismului de VHC se produce numai la 20% dintre pacienții tratați, dar asocierea IFNα cu *ribavirină** este eficace în 40% dintre cazurile tratate. Tratamentul se adresează cazurilor acute sau cronice.

* Ribavirina este o nucleozidă purinică sintetică, asemănătoare guanozinei şi inozinei.

Imunosupresia cu corticosteroizi scade nivelul aminotransferazei serice, deşi titrul viral seric creşte, iar după stoparea imunosupresiei, maladia cronică a ficatului se exacerbează, ceea ce sugerează rolul imunității în producerea leziunilor hepatice.

Vaccinul protector ar trebui să conțină antigene de la serotipuri multiple pentru a oferi o protecție globală. Bariera insurmontabilă pentru obținerea unui vaccin eficient este variația antigenică a multor agenți patogeni care prezintă o diversitate antigenică înaltă. Dacă toate variantele antigenice ar fi cuprinse în vaccin, doza devine prea mare, cu riscul efectelor secundare adverse. Vaccinurile subunitare obținute prin tehnici de inginerie genică sunt promițătoare.

Bibliografie

Santolini E., Migliaccio G., La Monica N. 1994. Biosynthesis and Biochemical Properties of the Hepatitis C Virus Core Protein. Journal of Virology vol. 68, no. 6: 3631–3641.

Howard C. R., Zuckerman A. J. 1990. Viral Hepatitis, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.
Cuthbert J. A. 1994. Hepatitis C: Progress and Problems – Clinical Microbiology Reviews. vol. 7, no. 4, pp. 505–532.
Houghton M. 1996. Hepatitis C Viruses, în vol. Fields Virology, third ed. ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincot – Raven Publishers, Philadelphia.
Blaine Hollinger F. 1990. Non-A, non-B Hepatitis Viruses, în vol. Virology, sec. ed., ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Irving W. L. 1998. Hepatitis C Virus, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.
Simmonds P., Mutimer D. 1998. Hepatitis C Virus, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, vol. IV Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier, 1998.
Zein N. N. 2000. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes – Clin. Microbiol. Rev. 13, 223–235.
Patick A. K., Potts K. E. 1998. **Protease Inhibitors as Antiviral Agents** – Clin. Microbiol. Rev. 11: 614–627.
Dustin L., Rice C. M. 2007. Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C – Annu. Rev. Immunol. 25, 51–69.
Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications John Wiley & Sons, Ltd.
Peters C. J., Dalrymple J.M. 1990. *Alphaviruses*, în vol. Virology, sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Schlesinger S., Schlesinger M. J. 1991. Replication of *Togaviridae* and *Flaviviridae*, în vol. Fundamental Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.
Rice C. M. 1996. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
Gubler D. J., Roehrig J. T 1998. Arboviruses (*Togaviridae and Flaviviridae*), în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.
Henchal E. A., Putnak J. R. 1990. The Dengue Viruses – Clin. Microbiol. Rev. 3, 4, pp. 376–396.
Gubler D. J. Burns J.A. 2008. Dengue Viruses, în vol. Desk Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.
Chambers T. J. 2008. Flaviviruses: General Features, în vol. Desk Encyclopedia of Human Medical Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, 2008 AP.
Batenschlager R., Buhler S. 2008. Hepatitis C Virus, în vol. Desk Encyclopedia of Human Medical Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.7. *Familia Asfarviridae* (Africa swine fever and related viruses)

Virusul febrei suine africane este singurul arbovirus cu genom ADN, unicul membru al acestei familii, agentul etiologic al bolii hemoragice, o maladie letală a porcului domestic.

Virionul cu diametrul de 175–215 nm, are o structură complexă:

- regiune centrală nucleoproteică (nucleoid), de 70–100 nm diametru, acoperită de un strat proteic gros. Regiunea centrală este înconjurată de două straturi lipidice interne, derivate din cisternele reticulului endoplasmic;
- capsidă icozaedrică formată din 1892–2172 capsomere, de 170–190 nm, cu un înveliş lipidic extern, ce se formează odată cu înmugurirea prin membrana citoplasmatică.

ASFV se aseamănă cu alte virusuri ADN cu multiplicare nucleo-citoplasmatică: *Pox-, Irido-, Phycodnaviridae*. Genomul este o moleculă de ADN dublu catenar, capetele închise covalent, cu secvenţe inversate repetate terminal. Virionul conţine peste 50 de proteine, inclusiv ARN-polimeraza. Informaţia este transcrisă în circa 150 cadre de citire, de pe ambele catene. Virusul se multiplică în citoplasmă, în situsuri discrete perinucleare (fabrici de virus).

Sinteza ARN este catalizată de enzimele regiunii centrale. Copiile sunt bonetate (5') şi poliadenilate (3').

În Africa sub-sahariană, ASFV se menţine în ciclul natural fiind transmis între porcul sălbatic şi căpuşa *Ornithodorus*. Ambele sunt gazde naturale infectate persistent. La porcul sălbatic tânăr, viremia este înaltă, iar la adulţi are titru scăzut şi infecţia este asimptomatică. Căpuşele *Ornithodorus* transmit infecţia atât pe orizontală, cât şi pe verticală, transovarian.

La porcul domestic ASFV produce infecţii variate, de la cele subclinice, până la cele cu mortalitate înaltă, în funcţie de factorii de virulenţă ai agentului infecţios şi de reactivitatea imunitară a gazdei. Virusul se multiplică în macrofage. Macrofagele infectate eliberează citokine (TNF-α), care induc apoptoza limfocitelor şi a megacariocitelor în măduvă. Limfocitele nu sunt permisive pentru multiplicarea virusului. Apoptoza limfocitelor în splină, ganglioni limfatici, în timus determină imunodeficienţa.

21.8. Familia Togaviridae

Familia *Togaviridae* (toga = înveliş strâns ajustat) reuneşte cei 26 reprezentanţi ai g. *Alphavirus*, adică togavirusurile transmise de artropode, de importanţă medicală (Sindbis, SFV = Semliki Forest Virus, *virusurile encefalitice equine*) şi g. *Rubivirus*. Sunt cele mai simple virusuri învelite. Capsida are simetrie icozaedrică, iar capsomerele sunt formate din molecule proteice identice. Genomul şi proteinele asociate formează *nucleocapsida*, învelită de un peplos, derivat din membrana plasmatică a celulei.

La suprafaţa învelişului proemină spiculele glicoproteice: E_1 şi E_2 formează un *heterodimer*. Spiculul proeminent pe suprafaţa virionului este format din 3 heterodimeri.

Togavirusurile produc zoonoze importante, omul fiind infectat de vectorul din rezervorul animal. Au un spectru larg de gazdă: infectează vertebratele şi artropodele vectoare hematofage. *In vitro* se multiplică în liniile celulare de mamifere şi de artropode.

Multiplicarea are loc în citoplasmă. Ataşarea virusului în celulele culturii este dependentă de pH şi de concentraţia ionică a mediului. Virionul se fixează prin intermediul spiculelor glicoproteice proeminente la suprafaţa învlişului. Anticorpii specifici faţă de glicoproteina E_2 neutralizează infecţiozitatea.

Receptorii de virus sunt multipli: proteine, oligozaharide, lipide. Moleculele CMH (H-2 la şoarece şi HLA la om) pot avea rolul de *receptori* prin care virusul se fixează la suprafaţa celulei, dar prezenţa lor nu este esenţială pentru infecţie, deoarece virusul foloseşte şi alţi receptori membranari. Virionul pătrunde în celulă pe calea *endocitozei mediată de receptori* (EMR). Acidifierea veziculei de endocitoză determină fuziunea învelişului viral cu membrana veziculei, eliberând nucleocapsida în citoplasmă şi dezvelirea genomului ARN. Aminele lizosomotrope ridică pH al veziculelor de endocitoză şi inhibă multiplicarea virală.

Alfavirusurile pot să pătrundă direct, prin *fuziunea învelişului* cu membrana plasmatică.

ARN genomic funcţionează ca ARNm. ARN-polimeraza codificată de virus transcrie ARN genomic într-o catenă negativă, cu rol de matriţă pentru ARN genomic progen.

Genomul este o moleculă de ARN mc de polaritate pozitivă. La *Alphavirus* conţine circa 11703 nucleotide, la care se adaugă 59 nucleotide netraduse la capătul 5' şi secvenţa poli-A (322 nt) la capătul 3'. Capătul 5' este metilat (cu metil-7G). Genomul este organizat în 2 domenii şi *8 unităţi de transcriere*.

Domeniul *nestructural* ocupă cele 2/3 ale capătului 5' şi codifică proteine *nestructurale* şi de replicare, iar domeniul *structural* formează 1/3 terminală a capătului 3' şi codifică proteinele *structurale*. Proteinele NS sunt traduse ca 1 sau 2 poliproteine chiar din ARN genomic, clivate în proteine nestructurale (P_1-P_4).

Domeniul structural este tradus ca o poliproteină dintr-un ARNm subgenomic, de 26S, bonetat şi poliadenilat.

Proteinele *nestructurale* traduse chiar din ARN genomic, catalizează sinteza catenei ARN complementare de lungime completă (49 S).

ARN genomic de 49 S poate urma 3 căi de evoluţie:

- se asociază cu ribosomii şi este tradus la proteine NS;
- se asociază cu un complex de replicare şi este transcris în mai multe copii de ARN negativ;
- târziu în ciclul de multiplicare, când în celulă se acumulează o cantitate mare de proteine virale, ARN 49 S de polaritate pozitivă se asociază cu proteinele capsidale şi formează nucleocapsidele.

În celulă funcţionează 2 categorii de ARNm: cel de 49 S (tradus în proteinele NS) şi altul de 26 S, tradus într-o *poliproteină* ce va fi clivată în cele 5 *proteine structurale*: proteina capsidei, 2 *polipeptide* mici asociate genomului şi *glicoproteinele* peplosului. In poliproteină, proteina capsidei este N-terminală şi are activitate *serin-protează cis* pentru a se elibera pe sine din catena nascentă. Ulterior poliproteina se pliază şi expune legăturile peptidice ce urmează a fi clivate, spre situsul activ al enzimei, astfel încât proteoliza este foarte rapidă.

Cele *4 proteine NS*, ca produse finale, îndeplinesc diferite funcţii: nsP_1 este necesară pentru iniţierea sintezei ARN de polaritate negativă; nsP_2 – probabil pentru iniţierea transcrierii ARNm 26S; nsP_3 – funcţie necunoscută ; nsP_4 – este probabil ARN-pol virală.

Asamblarea şi înmugurirea presupune integrarea celor 3 elemente structurale ale virionului: nucleocapsida, învelişul lipidic şi spiculele glicoproteice. Asamblarea capsidei cu ARN 49 S are loc în apropierea membranei plasmatice, la situsurile de inserţie a glicoproteinelor virale.

Pe baza specificităţii serologice, alfavirusurile sunt grupate în 6 complexe antigenice: western equine encephalitic (wee), venezuelean (vee), eastern (eee), semliki forest (sfv), Middelburg şi Nadumu virus (Peters şi col. 1990). Fiecare complex cuprinde o singură tulpină de virus sau câteva variante.

Cultivare. In vitro, alfavirusurile se multiplică în embrionul de găină, dar şi în liniile celulare continui: BHK-21 şi VERO. Infecţia celulelor vertebratelor este *citolitică*, iar infecţia celor mai multe tipuri celulare de nevertebrate este *persistentă*, fără ECP evidente. În celulele enucleate de ţânţar, multiplicarea este foarte limitată, dar este aproape normală în celulele enucleate ale vertebratelor. Tratamentul îndelungat cu α-amanitină sau cu actinomicină D (inhibitori ai transcrierii) diminuează rata multiplicării, ceea ce denotă dependenţa de funcţiile nucleare.

Proteinele virale sintetizate în celulele insectelor au conţinut scăzut de glucide şi *nu au acid sialic*, pentru că celulele sunt lipsite de activitatea sialil-transferazei.

Unul dintre mecanismele inducţiei ECP poate fi creşterea concentraţiei ionilor de Na^+ în celulă, după infecţie, situaţie ce favorizează multiplicarea virală. Concentraţia crescută de Na^+ favorizează traducerea ARNm viral şi este inhibitorie pentru traducerea ARNm celular.

Patogeneză şi patologie. Alfavirusurile au un spectru larg de gazdă, reprezentat de păsări, rozătoare, primate şi mai rar equidele, lilieci, ţânţari, căpuşe, ce pot fi infectate atât natural, cât şi experimental. La vertebrate, multiplicarea primară are loc în celulele liniei mieloide şi limfoide sau în celulele endoteliului vascular. Răspunsul vertebratelor la infecţie este foarte variat, de la infecţia inaparentă (cu sau fără viremie detectabilă), până la *encefalita severă* cu sfârşit letal. Reptilele şi amfibienii sunt sensibile la infecţia experimentală cu alfavirus. Multiplicarea în SNC depinde de capacitatea virusului de a depăşi bariera hemato-encefalică şi de a infecta neuronii.

Cele mai multe infecţii naturale la păsări şi mamifere sunt inaparente. În faza viremică, de câteva zile, artropodele vectoare preiau virusul odată cu sângele.

La om, infecţia variază de la cea inaparentă, până la febra acută şi uneori cu maladii severe fulminante cu morbiditate şi mortalitate înalte. Organele infectate sunt muşchii striaţi, plămânul, ficatul, creierul, articulaţiile, sistemul fagocitar mononuclear. Infecţia este asociată cu encefalită (în Lumea nouă), cu febră, erupţie veziculară, poliartrită (în Lumea veche). De cele mai multe ori, infecţia este stopată înainte de a invada SNC. Neuroinvazia depinde de nivelul viremiei, de factori genetici ai gazdei, de răspunsul imun, de virulenţa virusului.

Multe infecţii ating proporţii epidemice. Rezervoarele de infecţie ale unor virusuri sunt animalele sălbatice: păsări rozătoare, primate, la care infecţia este inaparentă, dar uneori infecţia evoluează chiar letal. Alteori sursa majoră de infecţie este omul.

Calul este cel mai sensibil şi după infecţia cu *virusurile encefalitice western, eastern şi venezuelean* face o encefalită letală.

EEE (eastern equine encephalitis) este transmis de *Aedes sollicitans* – hematofag pentru păsări şi mamifere. Este transmis şi la om.

WEE (western equine encephalitis) produce encefalita la cal şi la om în vestul Americii de Nord.

VEE (venezuelean equine encephalitis) produce encefalita la cal şi la om în America centrală şi de sud. O epizootie din '69 (Peru) s-a propagat în Texas şi până în '71 a omorât 200.000 de cai.

De cele mai multe ori gazda vertebrată nu suferă o infecţie clinică.

Studiile experimentale sunt justificate atât pentru importanţa lor intrinsecă, cât şi pentru potenţialul patogen relevant al infecţiei umane. Rozătoarele se inoculează intracerebral. Animalele tinere sunt mai sensibile. Sensibilitatea la infecţie este condiţionată de factori imunitari, dar şi genetici. Virusul se multiplică în muşchii striaţi şi în muşchiul cardiac. Multiplicarea în neuroni produce liza.

Epidemiologie. Alfavirusurile sunt transmise în primul rând prin înţepătura ţânţarilor, dar şi de căpuşe. Sunt diseminate de păsările migratoare. Strategia de propagare este trecerea succesivă de la ţânţar la vertebrat şi din nou la ţânţar. De multe ori, omul este infectat accidental, fără semnificaţie

pentru propagarea virusului. Toate alfavirusurile patogene pentru om se multiplică şi sunt transmise de ţânţari. Vectorul se infectează fără patologie semnificativă. Alfavirusurile multiplică în tubul digestiv la ţânţarii *Aedes aegypti, Culiseta melanura, Culex tarsalis*, dar ajung şi în glandele salivare.

La om, infecţia are grade diferite de severitate: de la cea asimptomatică până la cea letală. De cele mai multe ori infecţia este subclinică sau determină o stare febrilă tranzitorie.

Unele produc infecţii ale SNC, iar altele sunt asociate cu o patologie articulară. Incubaţia este scurtă şi este asociată cu viremie, ce durează câteva zile: febră, dureri de cap, mialgii, leucopenie.

După o singură infecţie se instalează imunitatea protectoare, atât humorală, cât şi celulară. Nu se cunoaşte mecanismul prin care anticorpii elimină infecţia din neuroni. În ariile endemice, imunitatea se consolidează prin infecţiile repetate inaparente.

Pentru *diagnosticul* infecţiei cu alfavirusuri se folosesc mai multe metode :

- *izolarea* virusului în cultură, posibilă în faza acută, în primele 48 de ore, când lipsesc anticorpii specifici. Ulterior, cantitatea de virus în ser scade rapid şi izolarea devine tot mai dificilă. Virusul se poate izola prin inocularea intracerebrală a puilor sugari de şoarece sau în celule Vero (de rinichi de maimuţă) şi culturi de celule de ţânţar;
- *detectarea Ac* specifici în ser. Toate alfavirusurile sunt înrudite antigenic şi dau reacţii încrucişate în tehnicile de imunodiagnostic. Reacţiile de HAI (hemaglutinoinhibare), ELISA şi imunofluorescenţă au definit 8 serogrupuri de alfavirusuri, 4 dintre ele fiind *wee, vee, eee, SFV* (Semliki Forest virus);
- tehnicile moleculare pentru detectarea genomului viral. Reacţia PCR foloseşte ADNc al ARN genomic;
- determinarea secvenţei de nucleotide sau reacţia de neutralizare cu anticorpii specifici monoclonali sunt metodele pentru identificarea virusului.

g. ***Rubivirus***, agentul rubeolei umane (denumirea semnifică aspectul roşietic al leziunilor tegumentare), o infecţie benignă, este singurul reprezentant al genului clasificat în familia *Togaviridae*.

Virionii sunt pleomorfi, mai ales sferici, de 60–70 nm. Regiunea centrală electrono-densă este separată de învelişul lipidic printr-o zonă electrono-clară. La suprafaţa învelişului proemină spiculele (E_1 şi E_2). E_1 este mai expus decât E_2, este hemaglutinant, are rol de ligand şi este imunodominant.

Structura, compoziţia şi organizarea genomului sunt asemănătoare cu acelea ale alfavirusurilor. ARN genomic (9762 nt) de 40S este 5'bonetat şi 3' poliadenilat, având rol de mesager pentru sinteza proteinelor NS şi matriţă pentru sinteza unui ARN de polaritate negativă. Genomul este organizat în două ORF: cel proximal capătului 5'- codifică cele 2 proteine NS, iar ORF proximal capătului 3' codifică proteinele structurale (C – capsida), E_1, E_2. Proteinele structurale sunt traduse ca un polipeptid precursor.

Virusul rubeolei (VR) se aseamănă cu *Alphavirus* pentru că are ca genom o moeculă de ARN mc de polaritate pozitivă, capsida quasisferică alcătuită dintr-o singură proteină (C), ce formează dimeri prin legături S-S, iar învelişul are două tipuri de spicule (E_1 şi E_2). Nu are ca vector un artropod şi nu este un arbovirus. Este distinct din punct de vedere antigenic de alfavirusuri. Rezervorul natural de virus este omul. Nu are alte gazde naturale. Nu se multiplică în culturile celulare de insecte, dar se multiplică lent (8–12 zile) la un titru scăzut, în celulele liniei VERO (AGMK), RK-13 (rinichi de iepure), BHK-21, fără ECP detectabil. De aceea, infecţiile persistente sunt comune şi nu pot fi eliminate cu Ac specifici pentru că virionii înmuguresc din membranele reticulului endoplasmic sau din cisternele Golgi.

VR este foarte bine adaptat pentru infecţiile persistente. Se transmite prin aerosoli. Situsul primar al multiplicării este epiteliul mucoasei bucale, al tractului respirator superior şi ţesutul limfoid nazofaringian. Virusul se diseminează, pe cale limfatică, în ganglionii limfatici regionali, unde se multiplică. După 7–9 zile, virusul ajunge în sânge. Viremia dispare după sinteza Ac specifici, la scurt timp după erupţia tegumentară eritematoasă. In perioada erupţiei, pacienţii sunt infecţioşi. Multe infecţii sunt asimptomatice, iar cele clinice au simptome uşoare.

În timpul sarcinii, ţesutul placentar este foarte sensibil la infecţie. Virusul se multiplică, rezultând focare necrotice şi leziuni ale endoteliului vascular. Din placentă, virusul se poate disemina în ţesuturile fătului, unde poate infecta aproape toate organele. Leziunile fetale severe sunt produse de

virusul *rubeolei* în primele 3 luni de dezvoltare. Manifestarea dramatică a procesului infecțios este *aspectul teratogen*. Infecția organismului matern în perioada primului trimestru al sarcinii prezintă un risc foarte mare de infecție pentru făt (spre 100%), asociată cu *sindromul congenital al rubeolei* (CRS). Rata CRS este mai mare de 50% dacă fătul este infectat în prima lună de sarcină, de 25% pentru luna a II-a și de 10% pentru cea de a III-a lună. După 3 luni de sarcină, eficiența transferului placentar al VR diminuează. Infecția fătului este cronică, nelitică, asociată cu anomalii congenitale multisistemice. La 18–20 de săptămâni, fătul infectat produce IgM, iar IgG matern traversează placenta, dar nu inhibă multiplicarea virusului. Infecția maternă nu duce totdeauna la CRS. Manifestările clinice ale CRS la naștere sunt variate: purpura trombocitopenică, întârzierea creșterii intrauterine, malformații cardiace, întârziere psihomotorie, defecte oculare (cataractă, glaucom, retinopatie), surzenie, hepato/splenomegalie. Cea mai comună malformație este surzenia. Consecințele pe termen lung ale rubeolei congenitale se reflectă în disfuncții endocrine (pancreasul, creind condiții pentru diabetul insulino-dependent – IDDM, tiroida) sau rareori, o maladie neurodegenerativă progresivă fatală (panencefalita progresivă rubeolică – PRP). Encefalita post-infecțioasă ce poate însoți rubeola acută ar avea cauză autoimună, pentru că virusul nu s-a izolat din LCR și nici din creier (Frey, 2008). În țesuturile fetale, proporția celulelor infectate este $1/10^3$–10^5, dar efectele sunt profunde, deoarece diviziunea celulară este inhibată, ducând la întârzierea și alterarea dezvoltării. Creierul pacienților CRS nu are malformații vizibile, dar tendința este spre microcefalie.

80% dintre copiii infectați congenital elimină virus pentru 10–15 luni după naștere.

La adolescenți și la tineri, rubeola clinică se manifestă ca o erupție maculopapulară, adenopatie, febră ușoară, conjunctivită, dureri în gât, artralgie. Erupția eritematoasă tegumentară este cea mai evidentă și apare la 16–20 de zile, inițial pe față, ulterior pe trunchi și membre.

Patologia VR se produce prin 2 mecanisme: ECP direct, care poate induce apoptoza și prin inhibiția diviziunii celulare.

Analiza secvenței de nucleotide a evidențiat existența a două variante genetice, dar secvența aminoacizilor diferă numai în proporție de 1–3% și nu se disting antigenic.

După infecția acută, se sintetizează IgM pentru 1–2 luni. Detectarea IgM este modalitatea curentă de diagnostic a infecției acute. Ulterior se sintetizează IgG și IgA. IgG_1 persistă pe termen lung după infecția naturală.

Bibliografie

Peters C. J., Dalrymple J. M. 1990. *Alphaviruses*, în vol. Virology, sec. edition, ed. by B. N.Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Schlesinger S., Schlesinger M. J. 1991. Replication of *Togaviridae* and *Flaviviridae*, în vol. Fundamental Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Gubler D. J., Roehrig J. T. 1998. *Arboviruses (Togaviridae* and *Flaviviridae)*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Wolinsky J. S. 1990. *Rubella (Togavirus)*, în vol. Virology, Sec. ed., Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Strauss J. H., Strauss E. G. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. Microbiol. Rev. 58(3): 491–562.

Miller B. R. 2008. *Arboviruses*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Frey T. K. 2008. *Rubella* virus, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Tulman E. R., Delhon G. A., Ku B. K., Rock D. L. 2009. African Swine Fever Virus – Current Topics in Microbiol. and Immunol., vol. 328, 2009, Editor James van Etten, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

21.9. Familia Bunyaviridae

Familia *Bunyaviridae* cuprinde mai mult de 300 de virusuri, majoritatea transmise de artropode. Au formă sferică cu diametrul de 80–120 nm, învelite. Învelișul derivă din membranele intracelulare sau din membrana citoplasmatică, în care proemină peplomerele (spicule) codificate de virus.

Cele circa 300 de virusuri infecțioase pentru om și animale ale familiei *Bunyaviridae* sunt grupate în 4 genuri, pe criterii serologice: *Orthobunyavirus* (Bunyamwera virus), *Phlebovirus*

(denumire derivată de la *Phlebotomus papatasii,* artropodul vector), *Nairovirus* (Nairobi sheep disease virus) şi *Hantavirus* (Hantan virus). Virusurile s-au descoperit în studiile pe artropodele hematofage. Unele sunt patogeni importanţi pentru om şi animale, dar majoritatea nu au importanţă medicală sau veterinară. *Orthobunyavirus* şi *Phlebovirus* sunt transmise de artropode. Ele produc infecţii benigne, febrile, mai rar infecţii ale SNC şi febră hemoragică. *Hantavirus* produce febra hemoragică cu sindrom renal (HFRS) sau sindromul pulmonar. Este transmis la om prin inhalarea aerosolilor de urină, fecale, salivă de şoarece. *Nairovirus* este agentul febrei hemoragice, cu mortalitate de 50%. Este transmis de căpuşe din g. *Ixodes*.

În alcătuirea virusului (fig. 405) intră 3 proteine majore: spiculele G_1 şi G_2 şi nucleoproteina capsidei (proteina N). Cea de a IV-a proteină structurală are funcţie de ARN-polimerază (proteina L).

Genomul este ARN mc, alcătuit din 3 segmente: *L*, (Large), *M* (Medium), *S* (Small). Fiecare segment genomic formează o nucleocapsidă individuală în virion, toate cele 3 fiind acoperite de un peplos comun. ARN genomic are polaritate negativă, dar segmentul S al g. *Phlebovirus* este ambisens, adică are proprietatea de codificare bidirecţională, ce se regăseşte numai la ARN al arenavirusurilor. Segmentul *L* codifică ARN-polimeraza, segmentul *M* – proteinele G şi NSm, iar segmentul *S* codifică proteinele N şi NSs.

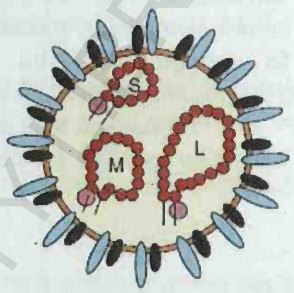


Fig. 405. Organizarea structurală a unui bunyavirus. Genomul este alcătuit din 3 segmente (L, M, S). ARN genomic este asociat cu proteina majoră (N) şi cu ARN-polimeraza (L). Pe suprafaţa virionului proemină spiculele celor două glicoproteine (după R. M. Elliot, 2008).

Primele 8–13 nucleotide la capetele 3' ale segmentelor genomice ARN au o secvenţă complementară (palindromică) cu cea de la capetele 5'. În consecinţă, segmentele se găsesc într-o conformaţie circulară laxă rezultată prin împerecherea nucleotidelor celor două extremităţi, dar nu sunt legate covalent.

Natura segmentată a genomului sugerează că există potenţialul reasortării în cazul co-infecţiei. Mecanismul reasortării a contribuit, probabil, la diversificarea genetică a acestui grup.

Multiplicarea. Virusurile se leagă prin intermediul glicoproteinelor de înveliş, pe receptorii celulelor sensibile şi sunt internalizate prin endocitoză. Se multiplică în citoplasmă şi se maturează prin înmugurire în membranele reticulului endoplasmic. Virionii sunt transportaţi în vezicule citoplasmatice, care fuzionează cu membrana şi eliberează virusul. Virionii pot să înmugurească direct din membrana plasmatică.

Glicoproteinele G_1 şi G_2, *in vitro* mediază hemaglutinarea, iar *in vivo* induc sinteza anticorpilor neutralizanţi. Anticorpii anti-proteina N fixează C.

Patologie. Bunyavirusurile produc infecţii, de la cele inaparente, trecând prin cele moderate, până la cele severe asemănătoare celei gripale, cu sau fără erupţie maculo-papulară, asociate cu febră, dureri de cap, mialgie, artralgie, frisoane sau encefalită, febră hemoragică cu hepatită necrotică. Unele bunyavirusuri produc encefalită transmisă de ţânţari, la om şi la animale, iar altele produc febră hemoragică.

În Europa şi Asia, *Hantavirus* produce febra hemoragică* cu sindrom renal (HFRS), iar în America produce un sindrom respirator acut fatal (HPS =sindrom pulmonar Hanta).

* Febrele hemoragice transmise de rozătoare sunt produse de reprezentanţi ai familiilor *Bunyaviridae, Arenaviridae* şi *Filoviridae*.

Diagnosticul infecţiei cu bunyavirusuri se pune utilizând metodele clasice: izolarea şi identificarea agentului infecţios şi evidenţierea răspunsului imun specific. Unele se multiplică în celulele liniei Vero, dar multe nu lizează celulele, ci le infectează persistent. Prezenţa lor se demonstrează prin metoda IF.

Majoritatea virusurilor s-au izolat prin inocularea intracerebrală a puilor sugari de şoarece, deoarece, la animalele mature bunyavirusurile produc infecţie cronică şi inaparentă. Unele sunt patogene pentru animalele tinere (şoareci şi hamsteri), chiar prin inoculare periferică. Sensibilitatea, specificitatea şi rapiditatea acestor metode sunt nesatisfăcătoare, ceea ce impune utilizarea metodelor serologice moderne şi a celor moleculare.

Bunyavirusurile nepatogene pentru rozătoare se izolează după evidențierea antigenelor în țesuturile gazdei. Unele se izolează prin inocularea culturilor celulare de țânțar sau chiar a țânțarilor. Izolarea trebuie confirmată prin metode serologice.

Pentru unele infecții, diagnosticul este rapid prin evidențierea Ag virale în sânge sau în țesuturi, prin metoda ELISA sau IF.

Transmitere. Fiind arbovirusuri, bunyavirusurile produc viremie cel puțin la o specie de vertebrate şi permit infecția vectorilor hematofagi. Se multiplică la artropode şi infectează glandele salivare, de unde sunt transmise la alte gazde vertebrate. Virusurile sunt transmise de diptere (*Culex, Aedes, Anopheles*, musculițe) şi pot produce infecții sporadice, dar pot să producă epidemii explozive în condiții de mediu favorabile dezvoltării vectorilor. Alte bunyavirusuri sunt transmise de *Phlebotomus papatasii*, un dipter de câțiva milimetri.

În sezonul rece, arbovirusurile se mențin prin infecția persistentă a vertebratelor, prin hibernarea vectorilor infectați. Unele bunyavirusuri sunt transmise de țânțari, pe verticală (transovarian).

Bibliografie

Schmaljohn C. S., Patterson J. L. 1990. *Bunyaviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Swanepoel R. 2004. *Bunyaviridae*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Elliot R. M. 2008. *Bunyaviruses:* General Features, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Carter J., Saunders V. 2007. Virology. Principles and Application, John Willey &Sons. Ltd.

21.10. Familia Arenaviridae

Este o familie mică, cu 14 membri. Denumirea (*arenos, arensos*, lb. latină = nisip, nisipos) semnifică aspectul granular-nisipos al virionilor în secțiune fină, pe imaginile electrono-optice, datorită faptului că ribosomii celulei sunt încorporați în mod obişnuit în virioni şi a fost aleasă pentru a evita confuzia Areno, cu Adeno.

Structură. Virionii sunt pleomorfi, morfologia tipică fiind cea sferică, cu diam. 90–110 nm. Sunt virusuri învelite cu peplos lipidic, pe suprafața cărora proemină spicule glicoproteice. Sunt sensibile la solvenții lipidici. Virionii se maturează prin *înmugurire* la suprafața celulei infectate. La locul înmuguririi, membrana celulei se îngroaşă, datorită glicoproteinelor virale care se inseră, iar ribosomii se aglomerează ordonat, adeseori circular şi aderă de membrană.

Din înveliş proemină *spiculii glicoproteici*, cu aspect butonat. In secțiunea fină a virionilor, la microscopul electronic, se observă un număr variabil de granule electrono-dense, ce seamănă cu ribosomii (20–30 nm diam). Din preparatele virale s-au izolat ribosomi şi subunități ribosomale, dar şi ARNr 28S, 18S şi 4–7S, caracteristice celulei. Ribosomii sunt funcționali, adică în sisteme acelulare, în prezența ARNm şi a factorilor specifici, sintetizează proteine. Nu se cunoaşte semnificația funcțională a prezenței lor în virioni.

Nucleocapsida constă din ARN genomic de *polaritate negativă*, asociat cu proteina N (nucleoproteina) şi apare sub forma a *2 structuri* circulare închise, deoarece capetele sunt asociate necovalent. Funcțional însă, ARN este *linear*, monocatenar, de polaritate negativă. Transcrierea catalizată de ARN-pol, trebuie să preceadă traducerea.

Genomul este format dintr-un *segment mare* (L), de 30–35 S şi unul *mic* (S), de 20–25 S. Cele două segmente se deosebesc prin secvența nucleotidelor (au informație genetică distinctă), nu au secvențe poli-A la capetele 3', iar capătul 5' nu este metilat. ARN genomic este asociat cu nucleoproteina (NP) şi are organizare helicală.

Diversitatea variantelor moleculare de ARN izolate din virioni denotă că în morfogeneza arenavirusurilor nu operează mecanismele de discriminare a componentelor proprii, atât de tipice pentru majoritatea ribovirusurilor. Nu se cunoaşte semnificația funcțională a componentelor celulare încorporate în structura virionului.

Virionii pot fi diploizi, adică conțin 2 copii ale segmentelor L și S.

Pleomorfismul poate fi consecința acumulării ribosomilor la situsul membranar al maturării și al încorporării lor în număr variabil.

În preparatele virale, prin metoda EF s-au identificat 4 proteine majore:

– *nucleoproteina* (N), asociată genomului;

– *glicoproteină de înveliș* (GP), care se clivează în GP_1 și GP_2, proeminente pe suprafața peplosului;

– *proteina L*, neglicozilată, cu rol de ARN-pol;

– *proteină mică ce leagă Zn* (Z).

Capătul 3' al *ARN S* este transcris în ARNm și codifică *proteina N*, iar capătul 5' al ARN S este tradus direct în *proteina GP*.

Segmentul L codifică *proteinele Z* și *L*: capătul 3' este transcris în ARNm, iar capătul 5' este tradus direct în proteină. Aceasta este funcționalitatea *ambisens* a genomului, care constituie un mecanism de reglare a transcrierii genice.

Multiplicarea. Receptorii celulari pentru virus sunt *glicoproteine* membranare, iar virusul este înglobat prin EMR.

ARN-polimeraza virală inițiază sinteza ARN, pe matrițele genomice.

Trăsătura distinctivă a multiplicării arenavirusurilor este capacitatea de a produce *titruri înalte de virus progen*, cu perturbări minime ale proceselor vitale ale celulei. Multiplicarea virală este compatibilă cu supraviețuirea celulei (corespunde sistemului independent echilibrat). Sinteza macromoleculelor celulei nu este inhibată într-o măsură semnificativă și de aceea nu se produce ECP evident.

Ciclul de multiplicare este lent, comparativ cu al altor virusuri cu genom de polaritate negativă: în 2–3 zile este atins nivelul maxim al producerii de virus.

ARN L și S sunt transcrise în copii complementare, iar acestea au rol de matrițe pentru sinteza replicativă a ARN genomic. Perioada de latență între adsorbția virionilor infecțioși și apariția virionilor progeni în mediul extracelular este de până la 8 ore.

LCMV (virusul coriomeningitei limfocitare) este prototipul familiei și s-a izolat în anii '30, de la un pacient cu encefalită, deși infecțiile umane sunt rare, dar produce infecții la șoarece, șobolan, hamster. La gazda naturală (*Mus musculus, M. domesticus*) produce 2 tipuri de infecții:

– *infecție acută*, uneori mortală, corelată cu stimularea viguroasă a IMC, mediată de limfocitele Tc. RI omoară gazda prin meningită sau conferă rezistență. Celulele infectate cu virus sunt eliminate de limfocitele CD_8^+;

– *infecție persistentă*, corelată cu IMC slabă.

LCMV a constituit modelul pentru infecțiile virale persistente, ceea ce a permis formularea unor concepte cu privire la înțelegerea interacțiunii Ag virale cu sistemul imunitar și la consolidarea rolului IMC în apărarea antivirală.

Din anii '60, LCMV s-a folosit în studii experimentale ale IMC indusă de virusuri. Modelul experimental al LCMV a oferit paradigma efectelor pozitive și negative ale IMC mediată de limfocitele Tc, pentru că are 2 proprietăți importante:

– *in vitro nu este citopatic*, ceea ce permite aplicarea testului eliberării Cr la 15 ore, test în care liza celulelor se datorează exclusiv acțiunii limfocitelor Tc;

– stimulează un *răspuns amplu al IMC**, mediat de limfocitele Tc, cu intensitate maximă la 7 zile după infecție și produce liza celulelor infectate.

* Doherty și Zinkernagel (premiul Nobel) au demonstrat, la șoarecii infectați cu LCMV, că limfocitele lizează, *in vitro*, numai celulele singenice (liza este restrictivă în raport cu identitatea moleculelor CMH a limfocitelor efectoare și a celulelor țintă). Liza este detectată prin testul eliberării Cr.

Infecțiile persistente nu activează limfocitele Tc, pentru că celulele expun o cantitate minimă de Ag virale pe suprafața lor.

Arenavirusurile se multiplică într-o varietate largă de celule mamaliene (fibroblaste de primate și rozătoare), dar în mod curent se utilizează celulele BHK 21 și linii celulare de rinichi de maimuță (Vero).

Epidemiologie. Rezervorul natural al arenavirusurilor este reprezentat de rozătoare. Nu s-a evidențiat transmiterea nici unui arenavirus de către artropode.

Arenavirusurile infectează persistent rozătoarele şi sunt eliminate prin *excreta*. Şoarecii se infectează la naştere sau în perioada perinatală. La puii de şoarece, infecţia induce starea de toleranţă, este persistentă, fără efecte patologice şi fără răspuns imun dectectabil. Animalele rămân infecţioase pentru toată viaţa, elimină virusul în urină şi prin alte fluide. La gazdele naturale (rozătoare), transmiterea se face atât pe verticală, cât şi pe orizontală, prin salivă, lapte, urină. Omul se infectează prin contactul cu rozătoarele, prin praful contaminat cu urină, prin contaminarea alimentelor sau a apei. Fiecare tip de virus infectează o singură specie de rozătoare. La contactul cu tegumentul lucrătorilor, virusul pătrunde în mediul intern prin microleziuni. Unele virusuri (tulpinile Lassa, Junin, Machupo, Sabia, LCMV) produc febră hemoragică severă, iar altele infectează fătul cu efecte letale.

Patologie. Unele arenavirusuri produc boli hemoragice severe: febra de Lassa (LCMV), febra hemoragică argentiniană (virusul Junin) datorită fragilităţii capilarelor, urmată de şocul ireversibil, dar şi alte sindroame descrise ulterior.

Sângele pacienţilor cu febra de Lassa (sat în Nigeria) este foarte infecţios şi de aceea, manevrarea sa impune precauţii speciale. Virusul febrei de Lassa este foarte virulent, cu o rată a mortalităţii de 15%.

Arenavirusurile produc frecvent *infecţii persistente*, ale căror mecanisme moleculare nu se cunosc. S-ar putea datora producerii particulelor virale defective, dar virionii defectivi se găsesc atât la tulpinile care produc infecţii acute, cât şi la cele care produc infecţii persistente.

O trăsătură particulară a celulelor infectate persistent este *relativa absenţă a Ag virale* expuse pe suprafaţă, chiar dacă în citoplasmă ele sunt abundente. Celulele infectate persistent sunt rezistente la suprainfecţia cu un virus omolog, dar sunt permisive pentru infecţia cu arenavirusuri heterologe.

Arenavirusurile, *in vivo,* au spectru de gazdă foarte limitat (*Cricetidae* – leming, *Muridae*), dar experimental se pot infecta şi alte organisme.

Cu excepţia LCMV, toate celelalte sunt denumite după aria geografică în care au fost izolate. Unele arenavirusuri (tulpinile Junin, Machupo şi Lassa) produc infecţii hemoragice severe la om, proporţionale ca intensitate cu titrul virusului infectant. Virusul persistă la purtători, datorită *variaţiei antigenice*, care permite evitarea RI.

Arenavirusurile sunt foarte plastice în privinţa capacităţii de a genera, prin procese mutaţionale, noi variante genetice (quasispecii) şi de a se adapta unor gazde noi, ilustrând concludent conceptul 'emergenţei virale'. Modficările mediului, provocate de popularea unor teritorii virgine, au tulburat echilibrul natural, ducând la apariţia unor noi maladii infecţioase, neaşteptate, care constituie riscuri importante de sănătate publică. Spectrul patologiei determinate de aceste virusuri este foarte larg.

Diagnosticul infecţiei cu arenavirusuri este serologic şi se bazează pe evidenţierea creşterii titrului de circa 4 ori a IgM specific sau prin izolarea virusului. Probele clinice suspectate de prezenţa virusului impun măsuri suplimentare de securitate. De aceea, testele pentru evidenţierea Ac sunt mult mai larg folosite, deoarece Ag virale (inactivate) pentru reacţiile serologice se prepară uşor. *In vitro*, ECP se evidenţiază greu şi de aceea culturile inoculate se examinează prin metoda IF sau imunoperoxidazei pentru detectarea Ag virale. Variatele tulpini de virusuri se diferenţiază utilizând AMC specifici faţă de epitopii care nu se exprimă în serul policlonal.

Răspunsul imun. LCMV este exemplul clasic de virus care induce leziuni determinate de activarea RI. Inocularea imediat după naştere duce la o stare de purtător pentru toată viaţa, fără leziuni. Puii sunt imaturi imunologic şi Ag virale stimulează RI. Inocularea intracerebrală la şoarecele adult produce o coriomeningită letală, fără leziuni neuronale. Imunosupresia prin timectomie neonatală sau prin ser anti-limfocitar (SAL) protejează faţă de efectul letal al infecţiei cu LCMV. Rowe (1954) a demonstrat că patogenia infecţiei cu LCMV nu depinde numai de ECP viral, ci este de natură imunitară.

La om, marea majoritate a infecţiilor cu LCMV sunt inaparente. Pentru infecţiile clinice, incubarea este de 6–13 zile şi pot fi influenza- like (cu febră, frisoane, dureri musculare şi bronşită), ca o meningită aseptică sau ca o meningo-encefalomielită. Forma meningeală este mai comună. In faza acută, un număr mare de celule mononucleare trec în LCR. Presiunea LCR creşte datorită creşterii concentraţiei proteinelor.

Uneori meningita progresează la forma severă a infecţiei, meningo-encefalomielita.

Celulele infectate cu LCMV sunt lizate de limfocitele Tc, iar recunoaşterea Ag necesită ca celulele infectate să prezinte Ag virale asociate cu moleculele CMH.

În al II-lea rând, experienţele au evidenţiat că stabilirea şi menţinerea infecţiei cronice este dependentă de factori ai gazdei şi de factori virali.

Prezenţa complexelor Ag-Ac la animalele infectate persistent a demonstrat că toleranţa celulelor B nu este implicată. Anticorpii se sintetizează faţă de toate proteinele majore structurale ale virusului. Se formează complexe Ag-Ac ce pot fi evidenţiate prin legarea C1q. Totuşi, serul şoarecilor infectaţi cu LCMV este negativ pentru testul fixării C, deoarece Ac nu persistă în ser, ci se leagă pe suprafaţa celulelor infectate, dar nu mediază liza dependentă de C.

LCMV se multiplică în limfocite, care constituie o sursă continuă de virus, dar şi în celulele SFM (macrofage peritoneale şi tisulare).

Infecţia cu un virus al familiei nu conferă protecţie humorală sau celulară, faţă de alte arenavirusuri. Şoarecii infectaţi persistent cu LCMV sintetizează anticorpi faţă de toate proteinele structurale majore. Anticorpii cu reacţie încrucişată pot conferi un grad de protecţie în unele cazuri.

Bibliografie

Bishop D. H. L. 1990. *Arenaviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. et al., Raven Press, Ltd., New York.

Howard C. R. 2004. *Arenaviruses* – în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

21.11. Familia Coronaviridae

Familia cuprinde virusuri mari (80–120 nm), învelite, cu genom ARN mc de polaritate pozitivă, care determină în primul rând, infecţii la om şi animalele domestice: infecţii respiratorii la om, gastroenterita la porc, la câine, la feline, hepatita murină etc. Unele virusuri infecţioase pentru animale (TGEV– virusul gastroenteritei porcine transmisibile, coronavirusul bovin – BcoV, virusul bronşitei infecţioase aviare – IBV) au importanţă veterinară. Denumirea vine de la morfologia particulară a virionilor pe preparatele colorate negativ: peplomere mari, numeroase, sub forma spiculelor glicoproteice proeminente din înveliş, aşa încât formează o coroană (fig. 406).

Virionii sunt înveliţi, de formă sferică (120–160 nm în diametru), cu genom ARN monocatenar unitar de polaritate pozitivă. Este cel mai mare genom dintre toate ribovirusurile (27–30 kb). ARN genomic pur este infecţios. La om coronavirusurile produc răceala comună, iar în 2003 un coronavirus nou a produs epidemia SARS (*s*indromul *a*cut *r*espirator *s*ever).

Familia cuprinde 2 genuri: *Coronavirus* şi *Torovirus*.

Structura. Genomul ARN, cel mai mare genom riboviral (30 kb), este asociat cu proteina N (o fosfoproteină bazică) şi formează o *nucleocapsidă*, lungă, flexibilă, cu *simetrie helicală*, acoperită de un *înveliş lipoproteic* derivat din cisternele Golgi şi mai rar din reg. Invelişul este format din dublul strat fosfolipidic în care sunt inclavate 2 sau 3 tipuri de glicoproteine:

– *S* (spike), o glicoproteină de tip I ce formează peplomerele suprafeţei şi pe imaginile electrono-optice dau aspectul de coroană;

– proteina *M* (membrane) traversează peplosul de 3 ori şi expune un domeniu extern N-terminal scurt;

– proteina *E*, foarte hidrofobă.

Unele coronavirusuri au o proteină suplimentară – HE (hemaglutinin-esterază).

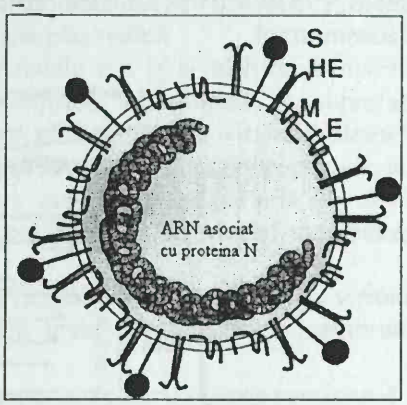


Fig. 406. Reprezentarea schematică a structurii moleculare a unui coronavirus. Virionul este format dintr-o nucleocapsidă alcătuită din ARN şi proteina N (o fosfoproteină), acoperită de peplosul în care sunt inclavate glicoproteinele virale. Spiculele S sunt glicoproteinele cele mai proeminente pe suprafaţa virionului şi conferă virionilor aspectul caracteristic de coroană. Proteina M este transmembranară, foarte hidrofobă şi are 3 domenii care traversează peplosul. Proteina E este o componentă minoră a peplosului. Unele coronavirusuri prezintă o proteină suplimentară, HE (hemaglutinin-esterază) (după Weiss, 2005).

Glicoproteina M este cea mai abundentă, fiind inclusă profund în înveliş, astfel că la suprafaţa învelişului este expusă numai regiunea N-terminală, glicozilată. Poate fi O-glicozilată sau N-glicozilată. Nu este transportată la nivelul membranei, ca majoritatea glicoproteinelor virale, ci se acumulează în cisternele Golgi, ceea ce explică înmugurirea coronavirusurilor la acest nivel.

Proteina S formează spiculii proeminenţi pe suprafaţa virionului. După sinteza în cisternele reg, proteina S este inserată atât în membranele reg, cât şi în membrana plasmatică şi are mai multe roluri: mediază legarea virionului de receptorul celular; induce fuziunea celulară; poate induce fuziunea învelişului viral cu membrana celulei; induce sinteza Ac neutralizanţi; stimulează IMC.

Un coronavirus poate avea multe variante antigenice (serotipuri). Organismul imunizat faţă de un serotip rămâne sensibil la infecţia cu celelalte serotipuri ale aceluiaşi coronavirus. Numărul mare de serotipuri este rezultatul frecvenţei înalte a recombinării, dar şi al evenimentelor mutaţionale.

In vitro, coronavirusurile au o perioadă de latenţă de 6 ore. Se multiplică în celulele speciei de origine sau ale speciilor foarte apropiate.

Majoritatea coronavirusurilor infectează o specie sau câteva înrudite şi multiplicarea este de obicei limitată la celulele epiteliale ale tractului respirator sau intestinal şi în macrofage. De aceea, izolarea este dificilă şi necesită culturi de celule diferenţiate: trahee de fetus uman sau celule ale mucoasei nazale.

In vivo, coronavirusurile au un tropism marcat pentru *celulele epiteliale* ale tractului respirator şi digestiv. Spre deosebire de majoritatea virusurilor învelite, coronavirusurile se multiplică în tractul intestinal. Ele produc infecţii uşoare sau inaparente la organismele adulte, iar la nou-născut, diaree severă.

La om, coronavirusurile produc 15–20% din infecţiile tractului respirator superior (răceala comună) şi sunt implicate în pneumonie şi miocardită. 50% din infecţiile care produc răceala comună sunt produse de rinovirusuri, iar restul de 30%, de adenovirusuri, parainfluenza RSV, influenza.

Coronavirusurile pot determina o infecţie *citocidă* sau *persistentă*, în funcţie de virus şi de celulă. Uneori celulele fuzionează, formând sincitii, după care se lizează.

Multiplicarea. Virionii se fixează pe receptorii celulelor sensibile prin intermediul spiculelor S. Proteina S îşi schimbă conformaţia şi mediază fuziunea peplosului cu membrana celulei, eliberând nucleocapsida în citoplasmă. Fuziunea nu este singura cale de pătrundere a coronavirusurilor. Pentru unele (SARS-CoV) s-a demonstrat existenţa căii endosomale, sensibilă la acţiunea agenţilor lizosomotropi.

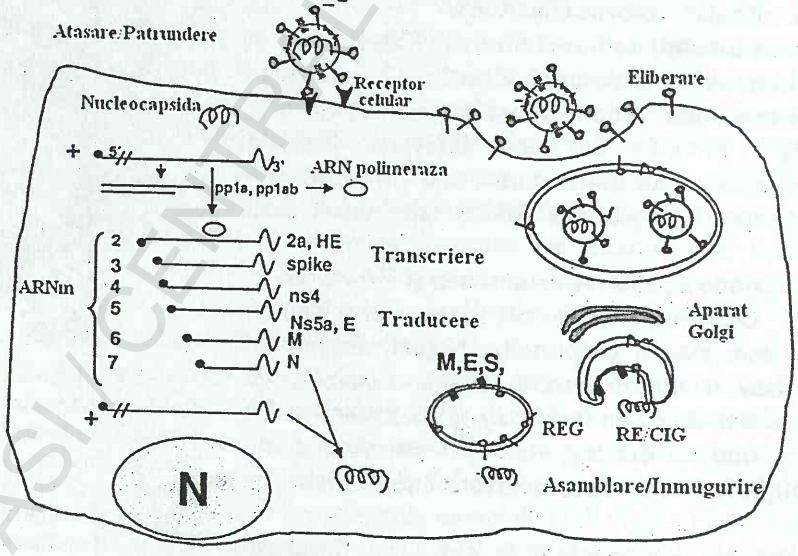


Fig. 407. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a coronavirusurilor. Virionul se leagă la receptorii celulari specifici prin intermediul spiculelor glicoproteinei S. Proteinele S îşi schimbă conformaţia şi mediază fuziunea peplosului cu membrana citoplasmatică, eliberând nucleocapsida în celulă. Cadrele de citire (ORF = open reading frame) 1a şi 1b de la capătul 5' al ARN sunt traduse în polipeptidele 1a şi 1ab. Polipeptidul 1ab este tradus prin mecanismul schimbării cadrului de citire, fenomen care se produce cu o frecvenţă de 25–30%. După prelucrarea proteolitică, din cele 2 polipeptide rezultă complexul ARN-polimerazei. Replicarea genomului are loc pe matriţa de polaritate negativă, de lungimea genomului. Proteinele virale sunt traduse din ARNm individuali subgenomici, ale căror secvenţe 3' sunt suprapuse. Fiecare ARNm are o secvenţă leader comună la capătul 5', de 75–78 nucleotide, derivate de la capătul 5' al ARN genomic. Proteinele M şi E se localizează în membranele Golgi, situsul probabil al înmuguririi după Weiss, 2005).

Receptorul de virus este *aminopeptidaza N*, o glicoproteină de suprafață exprimată abundent pe suprafața apicală a celulelor epiteliale ale tractului respirator și digestiv, ale tubilor renali și la nivelul sinapselor. Este o protează ce leagă Zn și catalizează clivarea resturilor N-terminale din peptide. Ea completează degradarea peptidelor scurte în intestin și inactivează neurotransmițătorii sinaptici în creier. Unele coronavirusuri umane folosesc ca receptori, moleculele CMH I.

ARN genomic, de polaritate pozitivă se asociază cu ribosomii. Expresia genomului începe cu traducerea a 2 poliproteine (1a și 1ab). După prelucrarea proteolitică co-translațională se formează complexul ARN-pol dependentă de ARN. ARN-polimeraza are rolul de a transcrie catena genomică într-o catenă complementară, rezultând forma de replicare, dublu catenară.

Catena antigenomică a formei de replicare are rol de matriță pentru sinteza replicativă a noilor catene și pentru transcrierea a 5–7 tipuri de ARNm cu dimensiuni subgenomice, de diferite lungimi. Suma lungimilor ARNm depășește cu mult lungimea genomului. Câteva dintre moleculele de ARNm sunt mult mai mari decât ARNm al celulelor eucariote. Mesagerii formează un set de molecule parțial suprapuse, deoarece capetele 3' sunt comune. Fiecare ARNm conține toată secvența de nucleotide a ARNm inferior ca mărime, plus o genă suplimentară la capătul 5'.

La ARN genomic și la toate variantele de ARNm, boneta m7G este atașată de o secvență leader de 60–70 baze, la capătul 5'.

Replicarea și transcrierea ARN, inițiate cu o secvență leader, explică frecvența înaltă a recombinărilor, neobișnuită pentru un virus ARN cu genom unitar.

Coronavirusurile au o frecvență înaltă a mutațiilor. La fiecare rund de replicare, ARN-polimeraza introduce una sau mai multe mutații, cu o frecvență mare a mutațiilor de deleție. Recombinarea se produce cu o frecvență mare, neobișnuită pentru un genom unitar, în timpul replicării ARN în infecțiile mixte.

Sinteza proteinelor, fiecare codificată de un mesager, contrastează cu ceea ce există la alte virusuri cu catenă de polaritate pozitivă (*Picorna, Toga*), al căror ARNm este tradus într-o poliproteină, clivată ulterior în proteine structurale și NS. La coronavirusuri, fiecare proteină este codificată de un ARNm propriu.

Asamblarea. Nucleocapsida este helicală, flexibilă, fragilă, greu de izolat și se asamblează în citoplasmă, prin interacțiunea ARN genomic cu moleculele proteinei N. Proteina N are situsuri de legare specifice cu nucleotidele, dar și activitate de legare nespecifică față de ARN genomic. Proteina S este distribuită atât în membranele intracelulare, cât și în membrana plasmatică

Virionii se asamblează prin înmugurire, inițial în membranele r e g și ulterior la nivelul cisternelor Golgi. La situsul de înmugurire, șiruri de nucleocapside se aliniază pe suprafața citoplasmatică a acestor membrane, în zonele în care s-au inserat glicoproteinele virale. Proteinele celulare sunt excluse din siutusul la care are loc înmugurirea și sunt înlocuite cu glicoproteinele virale.

Interacțiunea primară a nucleocapsidei cu membrana r e g sau Golgi se face prin domeniul citoplasmatic al glicoproteinei S. Deși cantități mari de M se pot acumula la nivelul membranei plasmatice, virionii nu înmuguresc la acest situs.

Virionii pot fi eliberați prin liza celulei, dar și din celula vie. De la cisternele Golgi, virionii sunt transportați în vezicule de r e n, până la periferia celulei, unde fuzionează cu membrana plasmatică și eliberează virionii în spațiul extracelular.

Capacitatea lor de a se elibera din celula vie este un factor important pentru *infecția persistentă.*

Caracteristic, pe membrana plasmatică a celulei infectate, la microscopul electronic se observă un număr mare de virioni, dar nu înmuguresc din membrană, ci se adsorb pe membrană după ce s-au eliberat. Antigenele virale stimulează RI.

Patogeneza. Coronavirusurile au specificitate pentru specia gazdă, spectrul de gazdă fiind foarte îngust. Cele care infectează animalele au tropism pentru celulele epiteliale ale tractului respirator sau gastrointestinal. La om, coronavirusurile infectează epiteliul tractului respirator superior.

Epidemia SARS a fost o zoonoză asociată cu infecții grave ale tractului respirator, inclusiv cu pneumonie la om. Virusul se transmite prin aerosoli, dar suprafețele contaminate, excreta și alte secreții pot să transmită virusul. Nu toți cei infectați transmit virusul.

Receptorul pentru SARS-CoV este ACE_2 (angiotensin converting enzyme 2), o metaloprotează cu Zn. Se consideră că virusul a trecut de la civetă (*Civettictis civetta civetta*) și a dobândit capacitatea de a infecta omul. Epidemia a început în sudul Chinei (provincia Guandong), unde se face un comerț intens cu animale ținute în captivitate. Perioada de incubație pentru SARS este

de 2–14 zile (o medie de 6 zile). SARS-CoV a fost bine adaptat să recunoască receptorul ACE-2 şi transmiterea interumană a fost foarte eficientă.

Modelul ipotetic al patogenezei SARS-CoV ar parcurge 3 faze: etapa multiplicării virale, a hiper-reactivităţii imunitare şi etapa distrugerii alveolelor pulmonare. Ţesutul pulmonar este infiltrat cu celule gigante multinucleate rezultate din fuziunea macrofagelor. Celulele epiteliului alveolar formează sinciţii, o trăsătură a multor coronavirusuri. Virusul se multiplică în celulele sinciţiale, care se lizează, reducând suprafaţa respiratorie.

SARS-CoV produce în primul rând o pneumonie severă, pentru că virusul infectează ţintele principale: pneumocitele de tip 1 şi 2. Cele de tip 2 sunt importante pentru repararea leziunilor pulmonare, dar infecţia acestor celule blochează răspunsul regenerativ al plămânului şi agravează dificultăţile respiratorii. Infecţia celulelor alveolare, macrofagelor şi celulelor dendritice interstiţiale nu induce sinteza IFN tip 1.

Patogeneza SARS-CoV este specifică. Infecţia cu SARS-CoV induce o hiper-reactivitate a sistemului imunitar înnăscut, sub acţiunea *citokinelor* eliberate de macrofage. *In vitro*, macrofagele infectate cu SARS-CoV se activează, iniţiază ciclul multiplicării virale dar nu eliberează virus progen (infecţie abortivă). La pacienţii SARS s-a raportat multiplicarea virusului în celulele mononucleate din sânge. Macrofagele şi CD infectate se activează şi răspund prin secreţia crescută a chemokinelor, detectabile în serul pacienţilor SARS, atractante pentru macrofage, ceea ce explică *infiltratul pulmonar* masiv cu aceste celule. Patogeneza SARS-CoV pare a fi datorată, în primul rând, unui *răspuns inflamator amplu*, activat de citokine şi nu unui răspuns imun specific faţă de antigenele virale. Patologia pneumoniei produsă de SARS-CoV este un exemplu de răspuns imun înnăscut, scăpat de sub control şi amplificat de citokinele eliberate de macrofage şi CD. Infecţia este asociată cu limfopenia.

Diareea este o manifestare frecventă (30–40%) a pacienţilor, deoarece virusul se multiplică în enterocite, cu tulburări minime ale arhitecturii mucoasei. SARS este o maladie sistemică, cu manifestări nespecifice (mialgie, tulburări digestive). Virusul se multiplică în plămân, dar şi extrapulmonar şi se izolează din ţesutul pulmonar, din secreţiile tractului respirator, scaun, urină şi chiar din sudoare.

Diagnostic. Coronavirusurile se izolează în celulele liniei Vero (fibroblaste renale de maimuţă verde africană) şi multiplică în culturi de ţesut traheal uman sau în CDU (celule diploide umane). Izolarea virusurilor *în vitro* nu este o practică obişnuită. Metodele folosite curent sunt cele de serodiagnostic (RFC, IF, EIA). Metoda sensibilă şi specifică de diagnostic este real time PCR pentru detectarea ARN viral în probele din tractul respirator, scaun, ser, urină. Aspiratul endotraheal are încărcătura virală cea mai mare. In primele 5 zile de boală, încărcătura virală este mică şi rezultatul PCR poate fi negativ. ARN viral rămâne detectabil în secreţiile respiratorii şi în scaun mai multe săptămâni după declanşarea bolii.

Bibliografie

Holmes K. V. 1990. *Coronaviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Weiss S. R., Navas-Martin S. 2005. *Coronavirus* Pathogenesis and the Emerging Pathogen severe Acute Respiratory *Coronavirus*. MMBR, 69, 4, pp. 635–664.

Norkin L. 1995. Virus Receptors : Implications for Pathogenesis and Design of Antiviral Agents. Clin. Micr. Reviews. 8, 2, p. 293–315.

Peiris J. S. M., Poon L. L. M. 2008. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.12. Familia Reoviridae

Denumirea derivă de la *r*espiratory *e*nteric *o*rphan, pentru că nici o maladie nu era asociată cu virusul specific. Clasificarea unui virus ca membru al familiei *Reoviridae* se bazează pe prezenţa unui genom ARN segmentat, dublu catenar (dc), precum şi pe unele caracteristici structurale şi de strategie a multiplicării.

Familia cuprinde 6 g: *Reovirus, Rotavirus* şi *Orbivirus*, infecţioase pentru o varietate de vertebrate şi pentru om. *Colorado tick fever virus*, clasificat anterior ca orbivirus, a fost denumit *Coltivirus*. Alte 3 genuri (*Cypovirus, Fijivirus, Phytoreovirus)* infectează numai insectele şi plantele.

Fiecare gen se deosebeşte de celelalte printr-un număr de proprietăţi fizico-chimice şi structurale: reovirusurile şi orbivirusurile conţin câte 10 segmente genomice, rotavirusurile au 11, iar *Coltivirus* are 12 segmente. Segmentele au lungime variată, între 680 şi 3900 nucleotide perechi.

Denumirile de gen reflectă aranjamente diferite ale subunităţilor proteice.

Rotavirusurile au o capsidă externă netedă, asemănătoare unei roţi, iar spiculele radiază din capsida internă.

La *Orbivirus* (orbis = inel), capsomerele capsidei interne au aspect de inel.

g. *Reovirus* mamalian este prototipul familiei şi are următoarele caractere: este nud, capsida este dublă, simetrie icozaedrică, conţine ARN-polimerază, genomul alcătuit din 10 segmente de ARN dc, este rezistent la solvenţii lipidici, iar în ciclul de multiplicare în citoplasmă nu se dezveleşte complet. S-au izolat 3 serotipuri de *Reovirus* infecţioase pentru om şi peste 77 variante de reovirusuri aviare. Cele aviare produc fuziunea celulelor, nu au activitate HA şi nu se multiplică în liniile celulare mamaliene.

Structura. Capsida externă este icozaedrică şi este formată din 92 (sau 180) capsomere hexa- şi pentagonale, fiecare fiind formată din 3 subunităţi. In alcătuirea capsidei externe intră 3 proteine: σ1, σ3 şi μ1C. Proteina λ2 proemină pe înveliş, deşi are origine internă. La cele 12 vârfuri ale icozaedrului proemină câte un spicul format din 5 subunităţi ale proteinei λ2, originar în regiunea internă. HA (delta 1) este asociată spiculelor şi are rol de fixare a virionului pe suprafaţa celulei.

Capsida internă are simetrie *icozaedrică* şi pare să conţină 122 capsomere, mai mici decât ale capsidei externe şi acoperă genomul.

Proteinele majore ale regiunii centrale sunt λ1, λ2 şi σ2, la care se adaugă 2 proteine minore (λ3 şi μ2).

ARN dc. Celulele infectate cu reovirusuri se colorează uniform cu acridin-oranj, ceea ce a dus la concluzia că ARN este dc (molecula de colorant se inseră în moleculele dc de acizi nucleici). Concluzia a fost confirmată prin centrifugare în gradient de densitate în sucroză. Este singura apariţie a ARN dc în natură. Moleculele nu hibridează una cu alta, sunt transcrise în molecule de ARNm specifice, iar la capătul 5' au secvenţe identice. Cele 10 segmente de ARN dc se observă prin EF în gel de PAA: 3 segmente mari, 3 medii şi 4 mici. Cele 2 catene ale fiecărui segment genomic sunt complementare.

Reovirusurile infecţioase pentru păsări şi mamifere conţin oligonucleotide de ARN, grupate în 3 clase de mărime:

- cele cu 2–20 *resturi de A* (circa 850 copii/virion) sunt mono-, di- sau tri-fosforilate la capătul 5' şi probabil sunt sintetizate în stadiile finale ale morfogenezei virale sub acţiunea catalitică a unei transcriptaze virale;
- oligonucleotide cu G la capătul 5' (2000 copii/virion), lungi de 2–9 nucleotide;
- oligonucleotide scurte alcătuite din 2–8 baze (circa 350 copii/virion).

Funcţia oligonucleotidelor din regiunea centrală a virionului este necunoscută. După infecţie sunt eliberate în celulă şi sunt metilate. Virionii care nu au oligonucleotide sunt infecţioase, ceea ce denotă că ele nu sunt necesare pentru infecţia productivă.

Studiile biochimice au evidenţiat 3 clase de proteine:

- segmentele genomice mari codifică 3 proteine mari (λ) componente ale regiunii centrale;
- segmentele medii codifică 2 proteine structurale şi una NS;
- cele 4 segmente mici codifică 3 proteine structurale şi 2 NS.

Multiplicarea. In vivo, reovirusurile au tropism şi se *multiplică* în *enterocitele* de la vârful vililor intestinului subţire, iar *in vitro*, în celulele de rinichi de maimuţă. Iniţierea infecţiei celulelor renale necesită adăugarea proteazelor la mediul de creştere a celulelor, care activează infecţiozitatea prin clivarea proteinelor capsomerei externe. Multiplicarea este citoplasmatică.

Adsorbţia se face în 15–60 min., între 4–37°. Adsorbţia la 4° permite sincronizarea infecţiei, dar pătrunderea în celulă are loc numai la temperatura fiziologică. Receptorul de virus al enterocitului este *glicoforina A*.

Penetrarea se face după modelul EMR. Virionii, individual sau în grup, în vacuole de fagocitoză, sunt transportaţi prin intermediul citoscheletului, spre centrul celulei, unde fuzionează cu lizosomii.

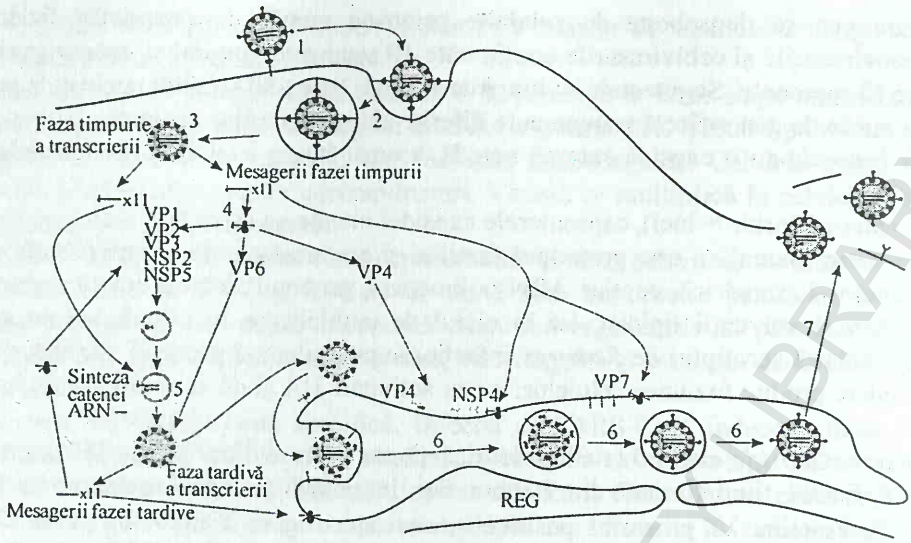


Fig. 408. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a reovirusurilor (după Carter şi colab, 2007).

Reovirusurile se transmit pe cale orală şi sunt prelucrate de proteazele digestive în lumenul intestinal. Digestia proteolitică nu inactivează virusul, ci remodelează capsida externă. Virusul este activat, după eliberarea proteinei majore δ3, clivajul proteinei μ1c şi a HA δ1. Virusul prelucrat proteolitic aderă de celulele M. Dezvelirea implică digestia proteolitică a capsidei externe. Rezultă particule subvirale, identice cu cele obţinute *in vitro* sub acţiunea chimotripsinei.

ARN-polimeraza virionică este inactivă, dar se activează *in vitro*, prin încălzire, prin digestie parţială cu chimotripsină sau cu un agent chelator. Se pare că enzima "activată" nu se modifică, ci matriţa ei (catena negativă) se eliberează din constrângerile structurale. Enzima este stabilă termic, cu un optim de activitate la 47–52° şi necesită un cation bivalent cu rol de cofactor. Transcrierea la reovirusuri este *conservativă* şi necesită ATP. Numai *catena de sens negativ* a ARN are rol de matriţă şi se sintetizează catene de polaritate pozitivă, de lungimea genomului. Catena de sens negativ, în timpul transcrierii rămâne asociată cu catena de sens pozitiv. ARN dc rămâne în regiunea centrală a virionului, iar copiile complete părăsesc capsida parţial dezagregată.

ARN dc se sintetizează numai în particulele virale nascente subvirale. In celulele infectate nu se găseşte ARN dc şi nici ARN mc de polaritate negativă.

ARN mc de polaritate pozitivă funcţionează ca ARNm. O parte a moleculelor de ARN mc se asociază cu ARN-pol şi cu precapsida şi au rol de matriţe pentru sinteza catenelor complementare cu care vor constitui ARN genomic dc.

În celula infectată predomină sinteza proteinelor virale pentru că este tradus preferenţial ARNm viral *nebonetat*, probabil prin modificarea dependenţei de bonetare a aparatului de sinteză proteică sub acţiunea unei proteine virale.

Asamblarea. ARN mc şi ARN-pol se asociază cu proteinele capsidei externe şi formează precapsida. ARN mc este convertit la ARN dc. După sinteza dublei catene, se asamblează capsida externă. Treapta finală a morfogenezei implică sinteza oligonucleotidelor. Virionii se eliberează prin liză.

ECP. În celula infectată se formează incluzii denumite "fabrici de virus" sau corpi de incluzie în care se găsesc ARN dc, proteine virale, virioni incompleţi şi completi. Lipsesc ribosomii, ceea ce impune ca ARNm să părăsească "fabrica de virus" pentru a fi tradus, iar proteinele nou sintetizate să fie reorientate spre "fabrică" pentru a fi asamblate în virioni. Microtubulii celulei au rol esenţial în tranzitul moleculelor.

În celulă, sinteza macromoleculelor este inhibată. Marginaţia şi condensarea cromatinei în blocuri heterocromatice semnifică inhibiţia sintezei ADN celular şi blocarea transcrierii.

Mecanismele care asigură asamblarea complementului genomic nu se cunosc. Segmentele genomice par a fi asociate prin interacţiuni necovalente, dar în co-infecţiile cu virusuri diferite ale aceluiaşi subgrup rezultă virioni cu genom reasortat, având segmente de la ambele tulpini virale parentale.

Infecţia persistentă. Infecţia tipică cu reovirusuri este cea *litică*, dar într-o varietate de sisteme celulare *in vitro*, se produc şi infecţii persistente: în fibroblastele embrionare umane, linia fibroblastică

L de şoarece, în celulele ovariene de hamster chinezesc. Infecţia persistentă este favorizată de preparatele virale obţinute prin pasaje la multiplicitate înaltă de infecţie, care conţin particule virale defective interferente, mutante prin deleţie (deleţia segmentului 4) şi mutante *ts*.

Reovirusurile sunt ubicvitare, au spectru larg de gazdă, dar nu sunt cunoscute ca agenţi patogeni pentru om. La adulţii tineri, serul conţine anticorpi specifici, a căror sinteză este indusă de infecţii inaparente.

Rotavirusurile sunt foarte bine adaptate gazdei: se multiplică eficient, au numeroase gazde animale, iar răspunsul imun nu sterilizează procesul infecţios. Infectează enterocitele şi produc diaree la copiii mai mici de 5 ani, la viţei, purcei, miei, păsări etc. Virionii sunt sferici cu diametrul de 75 nm, simetrie icozaedrică, cu structuri asemănătoare cu spiţele unei roţi, dar pe preparatele criomicroscopice (metoda care permite observarea spiculelor), diametrul virionilor este de 100 nm. Aspectul de 'roată' la ME este definitoriu.

Structura. Virionul este o particulă triplu stratificată, deoarece capsida are 3 straturi de capsomere, fiecare strat fiind alcătuit dintr-o proteină distinctă. Proteinele structurale formează un strat intern (alcătuit din VP_2), unul intermediar (format din VP_6, cea mai abundentă şi cea mai antigenică proteină virală) şi unul extern (capsida externă), alcătuit din 780 de copii ale glicoproteinei VP_7 şi 60 de spicule formate din trimeri de VP_4. VP_7 este o proteină glicozilată, neobişnuită pentru un virion nud. Glicozilarea sa are loc în cisternele reg, înainte de a fi încorporată în virion. VP_4 formează spicule la suprafaţă. Ambele proteine (VP_4 şi VP_7) stimulează sinteza Ac neutralizanţi. Efectul neutralizant se produce atât *in vivo* cât şi *in vitro*.

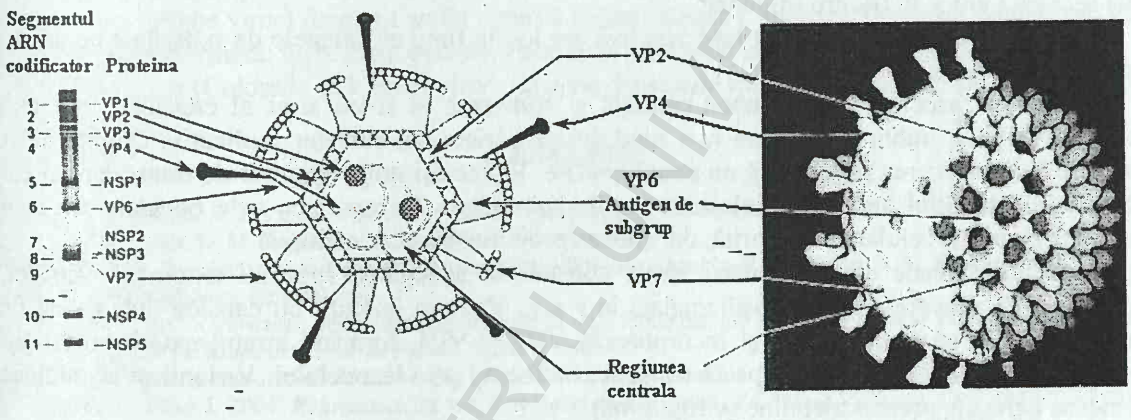


Fig. 409. Profilul ARN în gel de poliacrilamidă cu SDS 10%, proteinele codificate şi structura unui rotavirus (după Desselberger şi colab., 2004). Amănunte în text.

Straturile extern şi intermediar sunt străbătute de canale, care permit transferul compuşilor din citoplasmă spre interiorul capsidei şi exportul copiilor de ARN în timpul multiplicării. În stratul mijlociu, capsomerele sunt aşezate radiar, ca spiţele unei roţi şi constituie componentul major al virionului.

În regiunea centrală sunt localizate alte 2 proteine structurale: VP_1 (ARN polimeraza) şi VP_3, dar şi genomul viral.

În funcţie de specificitatea antigenică a proteinei VP6, rotavirusurile s-au clasificat în 7 grupe serologice (A – G). .Rotavirusurile au o restricţie importantă a spectrului de gazdă: omul este infectat de grupele A, B, C. Cele de grup A sunt cei mai frecvenţi agenţi patogeni umani. În zonele temperate, infecţiile sunt mai frecvente în lunile reci.

Genomul este alcătuit din 11 segmente de ARN dc (asociate cu nucleoproteinele VP_1 şi VP_3), ce codifică 6 proteine structurale (VP1, 2, 3, 4, 6, 7) şi 6 proteine NS (NSP1-NSP6). Enumerarea proteinelor se face în ordinea dimensiunilor. Fiecare segment conţine un singur ORF, cu excepţia segmentelor 9 şi 11, care sunt citite în câte 2 ORF.

Rotavirusurile sunt variabile din punct de vedere antigenic. Variabilitatea se produce prin rata înaltă mutaţiilor punctiforme, prin reasortarea segmentelor genomice, care are o frecvenţă crescută în cazul infecţiilor mixte cu 2 sau mai multe variante antigenice şi prin recombinare, un fenomen mult mai rar, dar probabil important în evoluţia pe termen lung (Angel şi Franco, 2005).

Multiplicare. Virusul se transmite prin ciclul fecal-oral. Rotavirusurile se fixează la vârful microvililor şi infectează *enterocitele.* Particulele triplu stratificate se ataşează prin VP4 la receptorii celulari (glicolipide cu acid sialic sau uneori galactoza) şi pătrund prin mecanismul EMR. Câteva integrine au rol de co-receptori. Clivarea proteinei spicul VP_4 în VP_8 şi VP_5 sub acţiunea tripsinei intestinale uşurează pătrunderea virusului în celulă. VP_8, VP_5 şi glicoproteina VP_7 interacţionază cu integrine ale enterocitelor. Multiplicarea este citoplasmatică.

Odată cu intrarea în celulă, sub acţiunea enzimelor lizosomale, membrana endosomului se permeabilizează, stratul extern al capsidei este dezagregat, iar particula acoperită de straturile mijlociu şi intern trece în citoplasmă şi este activată transcrierea. Fiecare dintre cele 11 segmente genomice este asociată cu o moleculă de ARN-pol (VP_1), care catalizează sinteza unei copii de ARN de polaritate pozitivă pe matriţa de polaritate negativă. VP_3 catalizează bonetarea capătului 5' al noilor catene de ARN în faza timpurie a transcrierii, care vor avea rol de mesageri. Nucleotidele pentru sinteza noilor molecule de ARN (fără secvenţa poli-A) intră în particula virală prin canalele straturilor proteice, iar catenele ies prin aceleaşi canale, trec în citoplasmă şi sunt traduse în proteine. In acest timp, ARN dc al virionului infecţios rămâne intact. Această modalitate de replicare se numeşte *conservativă.*

Proteinele virale se acumulează în citoplasmă, în zone discrete (viroplasmă), unde se asamblează regiunea centrală a virionului din VP_1, VP_2 şi VP_3. Catenele noi de ARN de polaritate pozitivă se asociază cu proteinele regiunii centrale. Un mecanism riguros de selecţie face ca fiecare regiune centrală să se asocieze cu câte un singur segment din cele 11 tipuri ce formează complementul genomic. Mecanismul funcţionează la toate virusurile cu genom segmentat şi constă în recunoaşterea unei secvenţe unice în fiecare segment.

Sinteza catenelor de polaritate negativă are loc în timp ce catenele de polaritate pozitivă sunt încorporate în regiunea centrală.

VP_6 se asociază cu regiunea centrală şi formează al II-lea strat al capsidei. In interiorul particulei cu strat dublu are loc un nou rund de transcriere, cu caracter replicativ. Copiile de ARN rezultate în transcrierea replicativă nu sunt bonetate. In acelaşi timp, aparatul de transcriere al celulei este modificat, astfel încât sunt selectate copiile nebonetate, în raport cu cele bonetate. Ca urmare, sinteza proteinelor celulare este oprită, dar sinteza proteinelor virale continuă.

Stadiile finale ale asamblării virale constau în adăugarea stratului extern al capsidei, cu spiculele VP_4 şi proteina VP_7, N-glicozilată în r e g. Virionii imaturi, cu capsida dublu stratificată, înmuguresc din cisternele r e g şi încorporează VP7 şi VP4, formând stratul extern (al III-lea) al capsidei. Virionii infecţioşi cu capsidă triplă sunt eliberaţi prin liza celulei. Virionii se acumulează şi formează agregate pseudocristaline (viroplasmă).

In vitro se multiplică în culturile secundare de rinichi de maimuţă şi în liniile imortalizate de rinichi, în prezenţa tripsinei.

Epidemiologie. Rotavirusurile sunt foarte contagioase şi infecţiile se produc cu o frecvenţă egală atât în ţările dezvoltate, cât şi în cele emergente, ceea ce denotă că măsurile de igienă nu sunt eficiente pentru controlul infecţiilor.

Patogeneza. Rotavirusurile irită sistemul nervos enteric şi induc diaree secretorie şi creşterea motilităţii intestinale. Necroza extensivă a epiteliului intestinal duce la atrofia vililor, reducerea absorbţiei şi la creşterea presiunii osmotice în lumenul intestinal, producând diareea. Urmează o hiperplazie reactivă a celulelor criptelor, însoţită de creşterea secreţiei de fluid, care contribuie la severitatea diareii.

NSP4 pare să aibă rol de *enterotoxină,* care induce secreţia celulară înainte de apariţia leziunilor histologice, rezultatul fiind diareea datorată malabsorbţiei Na^+ şi glucozei, pentru că celulele lezate sunt înlocuite cu celule imature neabsorbante ale criptelor. NSP4 secretată din celulele infectate, se leagă de un receptor celular şi induce efecte toxice, în afara procesului infecţios, producând creşterea concentraţiei de Ca^{2+} intracelular şi perturbarea echilibrului celular. Anticorpii anti-NSP4 diminuează severitatea bolii diareice la şoarecii sugari.

Deshidratarea, pierderea electroliţilor şi acidoza pot fi fatale la copiii cu vârsta între 6 luni şi 2 ani. Infecţiile medii durează 3–8 zile şi recuperarea este completă. Eliminarea virusului continuă, după dispariţia manifestărilor clinice, încă câteva zeci de zile. Contacţii adulţi se infectează şi sintetizează anticorpi specifici (seroconversie), dar rareori fac simptomele infecţiei. Virusul se detectează rareori în scaun. Reinfecţiile sunt comune, iar după infecţia primară creşte frecvenţa infecţiilor inaparente.

Sursa de infecție este contactul cu copiii mici infectați. Boala epidemică severă se manifestă și în comunitățile închise de persoane vârstnice. Omul este singurul izvor natural de infecție pentru rotavirusurile patogene pentru copii. Contaminarea este de 100% până la vârsta școlară, dar starea de purtător și reinfecțiile sunt posibile chiar în condițiile unei reactivități iumunitare optime.

Nivelul sIgA se corelează cu rezistența la infecție. Celulele Tc răspund specific la Ag virale, dar rolul lor în stoparea infecției sau în protecția față de infecție nu este cunoscut.

Diagnosticul infecției cu un rotavirus presupune evidențierea virusului în scaun în stadiul timpuriu al maladiei diareice, prin metoda aglutinării particulelor de latex sau ELISA și a creșterii titrului anticorpilor serici.

Vaccinul atenuat s-a obținut din rotavirusuri bovine și simiene. Protecția față de infecție este modestă, dar protecția față de diareea severă cu deshidratare este semnificativă (70–80%).

Rotavirusurile se cultivă, cu condiția ca preparatul viral să se trateze cu *tripsină*, iar tripsina să se adauge în cantitate mică în mediul de creștere a celulelor. Tripsina clivează o proteină a capsidei și ușurează procesul dezvelirii.

Tratamentul infecției urmărește restabilirea echilibrului hidroelectrolitic, prin administrarea intravenoasă sau orală a soluției de săruri și glucoză.

Pentru că virusul se transmite pe calea fecal-orală, tratarea apei uzate și instituirea condițiilor sanitare sunt importante pentru controlul infecției.

Orbivirusurile infectează, în mod obișnuit, insectele. De la insecte, unele sunt transmise la vertebrate. Se cunosc peste 100 serotipuri, dar nu au semnificație clinică pentru om. Virusul limbii albastre (blue tongue virus) denumit astfel datorită culorii albastru intens a limbii animalelor infectate, are importanță veterinară: infectează ovinele, caprinele, cornutele și rumegătoarele sălbatice.

Coltivirus (Colorado tick fever virus- un arbovirus) este transmis de căpușe și infectează omul.

Bibliografie

Schiff L. A ., Fields B. N. 1991. *Reoviruses* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Fields B. N. 1996. *Reoviridae*, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Estes Mary K. 1991. *Rotaviruses* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Wickner R. B. 1996. *Double-stranded RNA viruses of Saccharomyces cerevisiae* Microbiol. Rev. 60(1): 250–265.

Desselberger U., Gray J. 2004. *Rotaviruses*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.

Angel J., Franco M. A. 2008. *Rotaviruses*, în vol. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology, editors Mahy Brian W. J., Regenmortel Marc H. V. Academic Press.

21.13. Familia Adenoviridae

Denumirea de "adenovirusuri" își are originea în faptul ca reprezentanții grupului s-au izolat inițial, din culturile de tonsile amigdaliene și din cele nazofaringiene ce formează inelul lui Waldeyer (Rowe, 1953).

Adenovirusurile sunt nude, de formă sferică, cu diametrul de 65-80 nm. Capsida are simetrie icozaedrică și este alcătuită din 252 capsomere: 240 de formă hexagonală (hexoni) și 12 de formă pentagonală (pentoni), așezate câte una la fiecare din cele 12 vârfuri ale icozaedrului. La fiecare vârf pentonic proemină câte o structură filamentoasă, denumită *fibră*, cu lungimi diferite de la un serotip la altul. Hexonii și pentonii sunt formați din proteine diferite.

Virionii conțin ADN (13%) și proteine (87%). Nu conțin lipide și sunt rezistenți (stabili) la eter sau etanol.

Virionii conțin cel puțin 12 tipuri de proteine structurale distincte (fig. 410). Ele intră în alcătuirea hexonilor (proteina II), a bazei pentonilor (proteina III), a fibrei pentonilor (proteina IV), proteina asociată bazei pentonilor (III a), proteine asociate hexonilor (VI, VIII, IX), proteine asociate ADN (V, VII, proteina de 55 kDa) și proteine asociate nanomerilor hexonici (X, XI, XII).

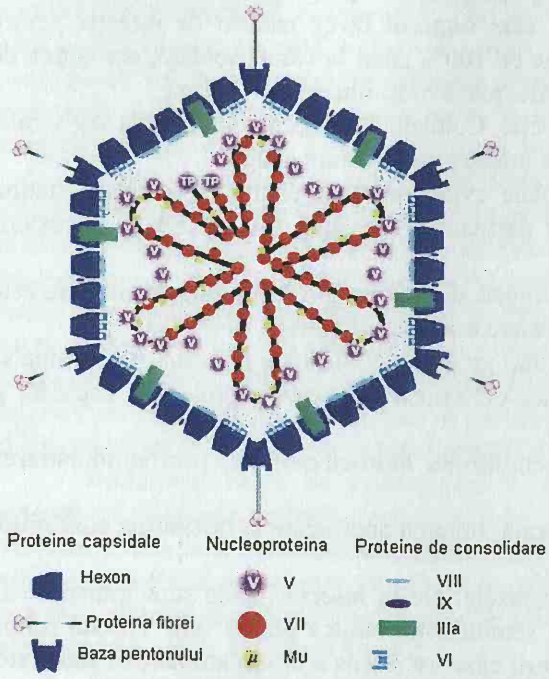


Fig. 410. Reprezentarea diagramatică a localizării proteinelor structurale ale unui adenovirus pe baza analizei virionului prin metoda crio-electron-microscopiei (după K. N. Leppard, 2008).

La electroforeză, după disocierea virionilor cu SDS (sodium dodecil sulfat), un detergent ionic puternic, s-au identificat 11–15 proteine.

Genomul adenovirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară şi prezintă particularitatea asocierii unui polipeptid de 55 kDa legat covalent de dCMP, la fiecare capăt 5' al genomului linear. ADN are repetiţii terminale inversate, lungi de 100–140 perechi de baze, diferite de la un serotip la altul.

Capsomerele *hexonice* sunt *trimere*, fiind alcătuite din trei molecule proteice identice, asociate prin interacţiuni necovalente. Cele 240 de capsomere hexagonale, conţin 720 molecule identice. In asociaţie cu hexonii sunt alte trei tipuri de polipeptide (VI, VIII, IX).

Capsomerele *pentonice* sunt formaţi din *5 monomeri identici* ai proteinei III, ce formează *baza,* iar *fibra* legată de penton, este alcătuită din alte trei molecule proteice identice (proteina IV).

Adenovirusurile umane sunt distribuite în 52 serotipuri distincte, ordonate în 6 subgrupe diferite (A–F). Clasificarea se bazează pe diferenţe serologice, biochimice şi particularităţi funcţionale. În subgrupe, serotipurile se diferenţiază prin reactivitatea celor 2 proteine majore: hexoni şi fibre.

În fiecare subgrup, omologia ADN este mai mare de 80%. Cele care produc enterită aparţin subgrupului F, serotipurile 40 şi 41.

Adenovirusurile sunt foarte diferite din punct de vedere *antigenic*. Toate serotipurile de adenovirusuri au un *antigen de grup comun*, cu reactivitate încrucişată, situat pe suprafaţa internă a capsomerelor hexonice (proteinele asociate hexonilor).

Serotipurile se caracterizează prin capacitatea lor de a induce sinteza anticorpilor neutralizanţi specifici. Un serotip poate fi definit ca o variantă antigenică dacă este neutralizată de un antiser heterolog, decât cel mult până la diluţia de 1/16. Proteinele care conferă specificitate serologică pentru cele 51 de tipuri antigenice, sunt cele ce intră în alcătuirea *hexonilor* (proteina II) şi proteina constitutivă a *fibrelor* (IV).

Adenovirusurile codifică sinteza unor proteine nestructurale, adică proteine care nu intră în alcătuirea virionilor, dar sunt detectabile în celula infectată.

Proteinele asociate ADN (V, VII, proteina de 55 kDa) sunt bazice şi au rolul de a neutraliza grupările acide ale ADN, uşurând procesul de împachetare. Au conţinut ridicat de arginină, ca şi histonele celulare, dar spre deosebire de acestea nu conţin triptofan.

Familia a fost divizată în 4 genuri:

- *Mastadenovirus* (mastos, lb. greacă = sân), cu 9 grupe infecţioase pentru mamifere (grupul bovin, canin, caprin, equin, uman, murin, ovin, porcin, simian). Cele peste 50 de serotipuri infecţioase pentru om sunt distribuite în 6 grupe: A, B (B1, B2), C, D, E, F;
- *Aviadenovirus*, cu 5 grupe infecţioase pentru păsări: raţă, găină, gâscă, fazan, curcă;
- *Atadenovirus* (denumirea derivă de la conţinutul înalt de A–T al genomului), izolate de la reptile, păsări, marsupiale şi rumegătoare;
- *Siadenovirus* (Si = sialidază), datorită prezenţei în genomul lor a unei gene presupusă a fi omologă genei sialidazei, infectează amfibienii şi păsările.

Ciclul de multiplicare

In vivo, adenovirusurile se multiplică în celulele epiteliale, iar *in vitro*, în celulele liniilor HeLa sau KB. Pentru sincronizarea ciclului de multiplicare, substratul celular se infectează la multiplicitate

foarte înaltă. Ciclul de multiplicare parcurge faze *timpurii şi tardive*, demarcate de momentul începerii replicării genomului viral. Distincţia dintre cele două faze nu este netă, deoarece unele tipuri de ARNm timpuriu se sintetizează şi în fazele tardive.

Adenovirusurile produc 3 tipuri de infecţii: infecţia litică, infecţia latentă/persistentă, infecţia malignizantă. În infecţia latentă, virusul rămâne în celulele limfoide.

Transformarea malignă a celulelor de embrion de şoarece, *in vitro* este indusă de câteva tipuri serologice (12, 18, 31).

Ciclul litic al multiplicării virale durează 32–36 ore. În acest interval, celula infectată îşi *dublează conţinutul de ADN şi proteine*. Creşterea este aproape în întregime datorată sintezei macromoleculelor virale. În stadiile tardive ale multiplicării, proteinele se sintetizează în mare exces şi formează *incluziuni nucleare* cu structură de tip cristalin.

Virionul se ataşează de receptorul celular – CAR (coxsackie adenovirus receptor) din suprafamilia Ig, prin intermediul *fibrei pentonice*. Anticorpii specifici anti-fibră, neutralizează infecţiozitatea virală. Acelaşi efect îl au anticorpii anti-hexoni peripentonali (baza pentonului se află în ambianţa a 5 hexoni). Virionul pătrunde în celulă prin *viropexie* (endocitoză mediată de receptori). Molecule din suprafamilia Ig au rol de receptori, iar integrinele sunt co-receptori. In vezicula de endocitoză, pH scade la 5,5. După ruperea ei, în circa 5 minute, virionul este eliberat în citoplasmă. Capsomerele pentonice (şi fibrele ataşate lor) se desprind din structura capsidei.

Virusul este transportat în citoplasmă, prin sistemul *microtubulilor*. Colchicina, deşi interferă cu asamblarea microtubulilor, nu inhibă multiplicarea virusului, dar *vinblastina* o stopează. Sub acţiunea vinblastinei, tubulina se agregă în structuri paracristaline perinucleare şi astfel particulele virale nu sunt transportate la sediul nuclear al dezvelirii şi multiplicării.

Prin sistemul microtubulilor, virionul ajunge la porii nucleari. ADN asociat cu proteinele sale, pătrunde în nucleu. Majoritatea proteinelor virionului rămân în citoplasmă. ADN viral se complexează cu *proteine histonice celulare* şi formează un complex întru-totul asemănător cromatinei nucleare.

Evenimentele *timpurii* sunt cele care preced sinteza replicativă a ADN:

- intrarea celulei în faza S, pentru a crea condiţiile favorabile multiplicării;
- expresia funcţiilor virale ce anihilează acţiunea mecanismelor protectoare ale celulei gazdă;
- sinteza componentelor necesare replicării ADN.

Transcrierea ARNm, timpurie şi tardivă, este catalizată de *ARN-polimeraza II celulară*. Transcrierea este inhibată de *α-amanitină*, un inhibitor specific al acestei enzime. ARN-pol II iniţiază transcrierea la 9 promotori ai moleculei genomice, câte unul pentru fiecare dintre cele 8 gene, cu excepţia E_2 care are doi promotori distincţi pentru faza timpurie şi respectiv tardivă a ciclului de multiplicare. In programul timpuriu sunt transcrise 5 unităţi (E_1A, E_1B, E_2, E_3, E_4), iar în programul tardiv, celelalte 4. Dintre cele 8 gene, numai cea care codifică proteina IX este tradusă într-o singură proteină. Copiile celorlalte gene au situsuri multiple de înnădire* şi poliadenilare, fapt care generează mesageri multipli, fiecare cu potenţial distinct de codificare.

* La adenovirusuri s-a descoperit fenomenul prelucrării ARN premesager. ARNm viral este prelucrat prin clivare şi *înnădire alternativă*, catalizate de enzimele celulare, ceea ce face posibil ca aceiaşi secvenţă de baze să aibă rolul de *intron* pentru unele copii de ARNm şi de *exon* pentru altele. S-a descoperit astfel că ARNm al celulelor eucariote, de obicei, nu este colinear cu secvenţele ADN, ci rezultă prin sudarea unor secvenţe codificatoare separate în genomul ADN.

Înnădirea alternativă amplifică potenţialul codificator al genomului adenovirusurilor. Genomul codifică sinteza a peste 50 de polipeptide diferite, dintre care 13 sunt *structurale*, iar restul sunt *nestructurale* şi au roluri multiple: în replicarea ADN, reglator şi în morfogeneza virionilor.

Se sintetizează peste 20 de proteine timpurii, multe dintre ele fiind NS, cu rol în replicarea ADN. Una dintre genele timpurii blochează programul morţii apoptotice a celulei.

Prima unitate de transcriere exprimată în ciclul de multiplicare este E_1A. Transcrierea E_1A catalizată de factorii celulari generează ARNm de 12 şi 13S. Proteinele codificate sunt necesare pentru multiplicarea productivă a virusului. Ele activează genele virale timpurii şi tardive.

Genomul are, în funcţie de tip, 1–2 gene VA (virus associated), transcrise de ARN pol III.

Replicarea ADN este declanşată după sinteza proteinelor timpurii, iar rolul de primer revine proteinei de 55 kDa de la capătul 5' al fiecărei catene (fig. 411).

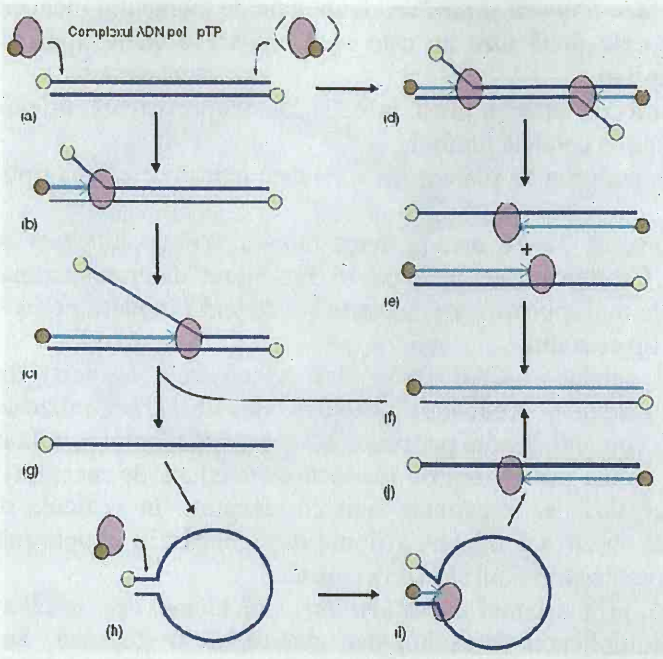


Fig. 411. Modelul general al replicării ADN la adenovirusuri. Linia de nuanță închisă reprezintă ADN parental. Linia de nuanță deschisă semnifică noua catenă de ADN. Săgețile pe catenele noi marchează capătul 3'. Cercurile de nuanță deschisă reprezintă proteina terminală (PT) atașată la capătul 5' al catenei parentale, iar cercurile de nuanță închisă semnifică precursorul proteinei terminale (pPT), cu rol de primer pentru sinteza noilor catene ADN. Ovalul reprezintă ADN-polimeraza. *a.* Complexul ADN-pol-pPT se asociază cu molecula genomică dublu-catenară. *b, c.* O singură catenă genomică este dislocată în direcția 5' – 3', iar catena 3' are rol de matriță pentru catena nouă. *d.* Ambele catene ale moleculei parentale, concomitent, au rol de matrițe pentru sinteza noilor catene. *e.* Cele două catene matrițe, împreună cu catenele nascente se separă. *f.* Sinteza catenei noi este completă. *g, h.* Catena parentală se circularizează prin împerecherea bazelor din secvențele terminale repetate invers. *i.* Catena circulară are rol de matriță pentru sinteza unei catene noi (după K. N. Leppard, 2008).

Evenimentele tardive ale multiplicării încep odată cu replicarea ADN. Expresia genelor L (Late) este controlată de un *promotor*, de unde se inițiază transcrierea unui premesager unitar (29 000 nt), ulterior prelucrat prin clivare și înnădire în cel puțin *18 molecule de ARNm tardiv*, transferate și traduse în citoplasmă.

Genele celulare continuă să fie transcrise în cursul infecției, dar foarte puține copii sunt transportate în citoplasmă. Un complex de proteine virale timpurii (E) inhibă transportul citoplasmatic al mesagerilor celulari, dar favorizează transportul ARNm viral. Se sintetizează în mare exces proteine virale cu rol structural.

Asamblarea virionilor are loc în nucleul celulei gazdă. Proteina hexonică se sintetizează în 3–4 minute și asamblarea, după sinteză, este rapidă. Asamblarea hexonilor este mediată de o proteină de "eșafodaj" (proteina necesară în timpul asamblării unei structuri, dar absentă în produsul final al asamblării).

Polipeptidele pentonice se sintetizează în 1,6 minute și se asamblează după o cinetică bifazică: baza pentonică se asamblează din 5 molecule identice ale proteinei III, iar fibra pentonică, din trei molecule identice ale proteinei IV.

Capsomerele sunt transportate în nucleu. Cele hexonice se asamblează în *capside goale*, procesul fiind asistat de proteine "de eșafodaj". Urmează câteva stadii succesive, în cursul cărora se asociază diferite proteine componente.

ADN nud intră în capsida preformată, pe la unul dintre vârfurile icozaedrului, din care lipsesc pentonii, după ce o secvență ADN cu rol de semnal de împachetare recunoaște capsida. In capsidă, ADN se asociază cu proteinele specifice și se pliază. In etapa finală, proteinele de eșafodaj sunt eliminate și icozaedrul se închide prin adăugarea pentonilor, la care au fost deja ancorate fibrele.

ECP. In vivo, adenovirusurile se multiplică în celulele epiteliale ale tractului respirator, gastro-intestinal, conjunctival și în limfocite.

Pentonii sunt citotoxici, iar proteinele timpurii neutralizează efectul TNF, inhibă apoptoza și expresia moleculelor CMH I și împiedică recunoașterea celulelor infectate de către limfocitele Tc. La microscopul electronic, aspectul structural caracteristic este marginația cromatinei (fig. 412).

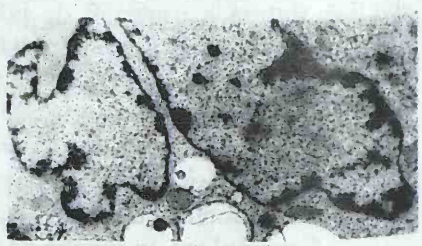


Fig. 412. Fenomenul de marginație a cromatinei, în celulele HEp-2, la 8 ore după infecția cu adenovirusul 3, x 40.000 (original).

Infecția cu adenovirusuri are efecte profunde asupra sintezelor macromoleculare ale celulei. Este inhibată sinteza

ADN şi a proteinelor (fig. 413, 414). Cauza principală a blocării sintezei proteinelor este *oprirea transportului ARNm celular spre citoplasmă*, deşi în nucleu transcrierea ARNm este foarte activă. Inhibiţia sintezei proteinelor celulare este rapidă după infecţie, deşi ARNm celular este stabil.

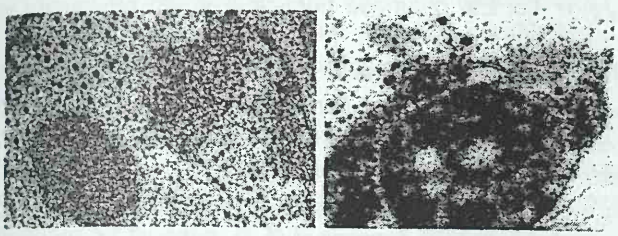


Fig. 413. ECP în celulele HEp-2 infectate cu adenovirusul 3. În stânga, segregarea componentelor nucleolare, granulară şi fibrilară. În dreapta se evidenţiază regiunea organizatoare a nucleolului, x 95.000 (original)

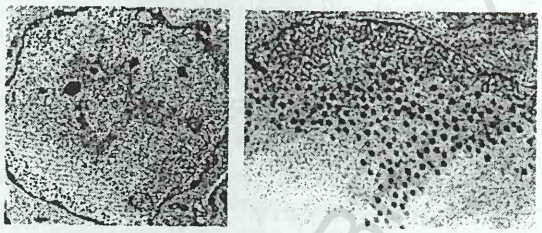


Fig. 414. ECP în celulele HEp-2 infectate cu adenovirus 3. În stânga, componenta granulară fragmentată a nucleolului are aspectul unor mase electronodense diseminate, x 60.000. În dreapta, proteinele virale sintetizate în mare exces formează incluzii nucleare paracristaline, x 150.000 (original).

Efectul multiplicării adenovirusurilor este *liza* celulei gazdă. Virionii progeni se eliberează după moartea şi dezintegrarea celulei. Cele mai multe particule virale progene nu sunt infecţioase. Raportul dintre numărul virionilor şi UFP variază între 11/1 şi 2300/1.

Adenovirusurile produc câteva tipuri de infecţii:

- litice, în special în celulele epiteliale;
- infecţii persistente latente în structurile limfoide ale inelului Waldeyer (tonsile, adenoide) şi ale mucoaselor;
- transformarea malignă, *in vitro*, a celulelor de rozătoare infectate cu serotipuri de grup A, care se integrează în genomul celulei şi stimulează proliferarea celulelor fără producerea virusului progen.

Patogeneză. Adenovirusurile se multiplică în celulele epiteliale ale tractului respirator, gastrointestinal, ale conjunctivei, vezicii urinare şi în ficat, cu excepţia serotipurilor 40 şi 41. Adenovirusurile produc 1/3 din totalul infecţiilor acute ale tractului respirator, unde infecţia ia forma rinitei sau faringitei, în funcţie de serotipul viral şi de starea pacientului. La copiii mici, infecţia poate evolua la pneumonie cu potenţial letal. De obicei, virusul nu se disemineză dincolo de ganglionii limfatici regionali. Cele mai multe tulpini virale se multiplică în epiteliul intestinal şi de cele mai multe ori, infecţiile sunt subclinice. Adenovirusurile produc circa 5% din totalul infecţiilor respiratorii la copii şi mult mai puţine la adulţi. Infecţiile sunt, de regulă, uşoare şi autolimitate. Uneori produc conjunctivită şi infecţii gastro-intestinale la copiii mai mici de doi ani. La băieţi şi la indivizii imunocompromişi, adenovirusurile produc cistită hemoragică şi virionii apar în urină.

Pacienţii imuno-compromişi suferă infecţii severe cu adenovirusuri. Pacienţii SIDA fac infecţii ale tractului gastrointestinal. La pacienţii cu transplant, adenovirusurile pot să producă pneumonie cu evoluţie fatală.

Mecanismele latenţei adenovirusurilor nu sunt cunoscute. Unul dintre ele ar fi modularea RI al gazdei. Virusul persistă perioade lungi (ani), se multiplică cu o rată foarte mică şi se eliberează periodic în secreţiile tractului respirator şi salivare.

Răspunsul imun înnăscut mobilizează macrofagele, complementul, celulele NK, sinteza citokinelor proinflamatorii, toate cu rol în eradicarea procesului infecţios. IFN poate induce apoptoza celulelor infectate. Răspunsul imun adaptativ este mediat de celulele TCD_4 şi TCD_8. Celulele TCD_4 recunosc Ag bine conservate la diferitele serotipuri de virusuri şi stimulează proliferarea limfocitelor B şi sinteza Ig.

Virusul evită efectorii RI prin mecanisme multiple:

- virusul codifică molecule de ARN (ARN asociat virusului =VARNA) transcrise de ARN-pol III, cu efect inhibitor al funcţiei PKR;

- inhibă apoptoza mediată de TNF şi Fas. TNF este o citokină proinflamatorie eliberată de macrofage şi de celulele T activate;
- inhibiţia expresiei moleculelor CMH I şi reţinerea lor în reg.

Răspunsul imun constă în activarea celulelor Tc. Ele recunosc peptidele virale prezentate în asociaţie cu moleculele CMH I şi lizează celulele ţintă.

Patologie. Adenovirusurile produc infecţii ale tractului respirator superior: serotipurile 1, 2, 5 (grupul A), iar serotipurile 3, 7 (grupul B) infectează tractul inferior (bronşită, bronşiolită, laringită (crup) şi pneumonie) şi produc, uneori, un sindrom asemănător tabloului clinic pertussis. Probabil că infecţia cu *B. pertussis* creează condiţii favorabile reactivării adenovirusurilor latente.

Adenovirusurile sunt agenţii febrei faringo-conjunctivale (conjunctivită foliculară, faringită), cheratoconjunctivită epidemică, infecţii gastro-intestinale, cistită hemoragică la copii şi la pacienţii imunocompromişi, cu hematurie amplă, creşterea frecvenţei micţiunilor.

Diagnostic. Metoda directă de diagnostic este izolarea virusului pe substrat celular uman de origine epitelială. Cele mai sensibile sunt celulele renale de embrion uman. Liniile celulare stabilizate (HeLa, Hep-2, KB) sunt sensibile, dar culturile sunt menţinute cu dificultate în stare viabilă pentru intervalul lung (28 de zile) necesar multiplicării izolatelor cu ciclul lent. Multiplicarea adenovirusurilor produce *acidifierea* mediului de creştere a celulelor, datorită creşterii ratei glicolizei, cu producerea acidului lactic. Scăderea valorii pH (virajul roşului fenol la culoarea galben citrin) este indicatorul multiplicării adenovirusurilor.

Serotipurile enterice 40 şi 41 se cultivă cu dificultate (se multiplică într-o linie celulară specială – 293).

La examenul microscopic, celulele infectate au nuclei mari, cu o margine subţire de citoplasmă şi incluzii bazofile. *ECP* constă în aglomerarea şi rotunjirea celulelor, cu incluzii intranucleare şi apare după un interval de 2–28 zile în funcţie de cantitatea de virus din inocul, de serotip şi de sensibilitatea celulelor. ECP trebuie confirmat cu AMC specifici, prin metoda IF.

Pentru diagnosticul gastro-enteritei acute, metoda directă de detectare, datorită numărului mare de particule virale (10^6–10^8/ml), este *examenul electrono-optic*. Genomul viral se detectează pe cale directă, prin metode moleculare, cu sau fără amplificare. Hibridarea moleculară se aplică pentru diagnosticul infecţiei pe secţiuni.

Detectarea directă a antigenelor virale se realizează prin testul IF, cu seruri imune specifice anti-proteină histonică în substratul celular infectat. Metoda este rapidă şi se foloseşte pentru identificarea virusurilor infecţioase pentru tractul respirator.

Metoda EIA este utilă pentru diagnosticul infecţiilor virale enterice în probele fecale, în care Ag este extracelular.

Genomul se evidenţiază prin metoda hibridării şi PCR.

Metodele indirecte de diagnostic sunt cele *serologice* şi constau în determinarea titrului IgG şi IgM. Sunt semnificative creşterile de cel puţin 4 ori a titrului lor între valorile din faza acută şi din convalescenţă. Metodele serologice includ fixarea C, ELISA, HAI, IF, neutralizarea.

Metodele serologice au câteva dezavantaje: IgM specific se detectează la 20–50% din totalul infecţiilor; un răspuns serologic slab oferă un rezultat fals negativ; răspunsul anamnestic heterotipic produce un răspuns fals pozitiv; au un caracter retrospectiv.

Infecţia cu un adenovirus induce sinteza anticorpilor specifici faţă de antigenul de grup. Metoda *fixării C* este folosită curent pentru diagnosticarea infecţiei cu orice tulpină de adenovirus. Creşterea de circa 4 ori a titrului anticorpilor, între faza acută şi convalescenţă este indicatorul infecţiei recente.

Epidemiologie. Adenovirusurile se găsesc în populaţia umană a întregului glob. Contaminarea se face în copilărie. Cele mai comune sunt serotipurile respiratorii (1, 2, 3, 5, 7) şi cele gastro-intestinale (40, 41). Adenovirusurile ocupă locul II, după rotavirusuri, ca agenţi ai diareii. De obicei nu produc epidemii explozive.

Adenovirusurile se transmit prin contact direct, prin aerosoli, pe cale fecal-orală, prin apă, instrumente oculare şi lenjerie. Infecţiile oculare pot fi contractate în piscină sau prin instrumentele oculare.

Persistenţa. Adenovirusurile infecţioase pentru om aparţin la peste 50 de serotipuri. Ele pătrund pe cale respiratorie, gastro-intestinală sau conjunctivală. Infecţiile acute sunt limitate la

celulele epiteliale ale tractului respirator, gastro-intestinal şi ochi. Cele mai multe infecţii sunt inaparente şi virusurile persistă luni de zile în organism, producând o infecţie *latentă* în celulele epiteliului intestinal şi în ţesutul limfoid.

Mecanismul latenţei nu se cunoaşte: ADN ar putea fi integrat în cromosomii celulei gazdă sau rămâne fizic independent, iar proteina codificată de regiunea genomică E_3 inhibă citoliza mediată de TNF şi, prin legarea de moleculele CMH I, blochează recunoaşterea epitopilor antigenici de către limfocitele Tc.

Adenovirusurile codifică proteine modulatoare ale răspunsului imun, probabil cu rol important în infecţia persistentă. Virusul se protejează de efectorii răspunsului imun şi persistă la un nivel scăzut pentru perioade lungi, cu eliberarea periodică a virusului infecţios în fecale şi în secreţiile respiratorii. Adenovirusurile 1, 2 şi 5 persistă în tonsile şi chiar în limfocitele circulante de la adulţii sănătoşi, pentru perioade de ordinul anilor, cu multiplicare la un nivel scăzut.

Mecanismele prin care adenovirusurile persistente evită acţiunea efectorilor imunitari sunt mutiple:

- inhibă funcţiile IFN prin intermediul ARN asociat virusului (VARNA) şi a E1A. VARNA este transcris de ARN-pol III a celulei şi începe timpuriu în ciclul infecţios. VARNA se asociază cu PKR şi inhibă efectele induse de IFN;
- inhibă apoptoza mediată de TNF;
- inhibiţia expresiei moleculelor CMH I. Proteinele timpurii ale virusului se asociază cu CMH I în reg şi blochează transportul lor spre membrană.

Animalele de laborator se infectează greu cu adenovirusuri, dar puii şi adulţii tineri de hamster sunt sensibili. Toate adenovirusurile pot să transforme celulele semi- sau nepermisive *in vitro*, dar potenţialul oncogen *in vivo* este foarte limitat: unele tipuri de adenovirusuri umane (12, 18, 31) induc tumori la puii nou născuţi de hamster. Genele transformante aparţin programului timpuriu (E), localizate la capătul stâng al genomului viral. Efectul tumorigen *in vivo* se asociază cu efectul unor gene timpurii de a inhiba sinteza moleculelor CMH I, astfel încât celulele nu pot să prezinte antigenele virale şi scapă detectării limfocitelor Tc. Adenovirusurile nu par să aibă rol semnificativ în dezvoltarea neoplaziilor umane.

Bibliografie

Horwitz M. 1990. *Adenoviruses*, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Horwitz M. 1990. *Adenoviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Martinez-Palomo A. 1968. Ultrastructural Study of the Replication of Human Adenovirus Type 12 in Cultured Cells. Path. Microbiol. 31: 147–164.

Echevaria M. 2009. *Adenoviruses*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology sixth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, B.D. Schoub P. D. Griffith P. Mortimer, Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, Ltd.

Hierholzer J. C. 1992. *Adenoviruses* in Immunocompromised Host. Clin. Microbiol. Rev. 5, 3, pp. 262–274.

Mihăescu Gr., Mişcalencu D., Ionescu M. D. 1979. Nuclear ultrastructural modifications of the adenovirus 3 infected cells of HEp-2 line. Rev. Roum. Biol., 1979, 24, 1, 23–28.

Mihăescu Gr., Gavrilă L., Mişcalencu D., Ionescu M. D. 1981. Experimental ribosomal gene amplification in thyoacetamide treated HEp-2 cells. Rev. Roum. Biol. 26, 2, 127–132.

Mihăescu Gr., Gavrilă L., Mişcalencu D.1982. Ultrastructural study of *adenovirus* 3 replication in thyoacetamide pretreated HEp-2 cells. Rev. Roum. Biol. 27, 2, 135–140.

Mihăescu Gr., Gavrilă L., Aderca I. 1984. Nuclear material expulsion from HEp-2 line cells during *adenovirus* 3 replication cycle. Rev. Roum. Biol. 29, 2, 138–141.

Mihăescu Gr. 1985. Inhibition of some deoxyriboviruses replication cycle in tannic acid pretreated cells. Rev. Roum. Biol., 1985, 30, 2, 175–179.

Gr. Mihăescu. Macrosegregation of nucleolar components of Hep-2 line cells after tannic acid treatment . Rev. Roum. Biol., 1985, 28, 1, 180–184.

K. N. Leppard . 2008. *Adenoviruses*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.14. Familia Herpesviridae

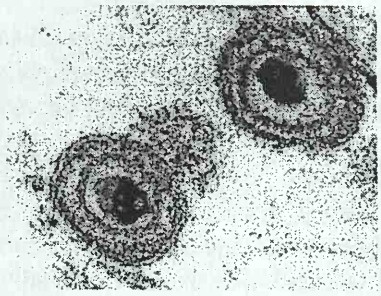


Fig. 415. Imaginea electrono-optică a virionilor HSV-1 în secțiune. Nucleoproteina electrono-densă ocupă zona centrală. Capsida cu contur hexagonal acoperă nucleoproteina. Tegumentul, un compartiment electronoclar, este amorf, iar peplosul are o structură tipic membranară, x 250.000 (original).

Familia *Herpesviridae* reunește peste 100 de virusuri diferite, infecțioase pentru toate clasele de vertebrate, cu importanță medicală considerabilă. Au proprietăți biologice particulare, deoarece produc infecții care rămân *latente* pentru tot restul vieții, dar sunt reactivate *periodic (infecții recurente)*, producând leziuni la sau lângă situsul infecției inițiale. Sunt bine adaptate la gazdele lor, adeseori infecțiile primare sau cele recurente fiind inaparente sau însoțite de manifestări clinice variate: herpesul labial, gingivo-stomatite, keratite, encefalite și malformații congenitale (*Herpes simplex virus – HSV 1*) sau infecții urogenitale (*Herpes simplex virus – HSV 2*). În regiunile temperate, virusul Epstein-Barr produce mononucleoza infecțioasă, iar în regiunile tropicale ale Africii este agentul limfomului Burkitt (tumoră a maxilarului, originară în limfocitele B).

Structura. Virionii au structură unitară, fiind alcătuiți din 4 elemente structurale:

- *regiunea centrală* conține ADN ce pare să se înfășoare de la interior spre exterior, pe un ax proteic central, formând o structură toroidală;
- *capsida proteică*, formată din 162 capsomere (150 hexoni și 12 pentoni), așezate după o simetrie icozaedrică. În alcătuirea capsidei intră *8 tipuri* de proteine. Capsomerele au formă cilindrică și sunt goale la interior. Atât hexonii, cât și pentonii sunt alcătuiți din aceiași proteină;
- *tegumentul amorf*, reprezentat de spațiul dintre înveliș și suprafața capsidei, ce conține cel puțin 20 de componente proteice. Proteina majoră este VP16 și probabil are rol în modularea interacțiunii virus-celulă, deoarece în ciclul infecțios este transportată în nucleu, unde se asociază cu ADN viral. Unele proteine ale tegumentului sunt esențiale pentru multiplicarea virală, altele conferă eficiență multiplicării, iar altele, *in vitro*, nu sunt necesare pentru multiplicare;
- *învelișul extern*, în care se găsesc inclavați spiculii. Învelișul și anexele sale conțin cel puțin 11 glicoproteine, care singure sau în asociație, au diferite roluri: adsorbția virionului, pătrunderea în celulă, diseminare, evitarea acțiunii efectorilor imunitari. Unele dintre ele au specificitate de familie sau de gen.

Toate proteinele structurale ale virionului sunt sintetizate în ciclul infecțios.

S-au descris *trei tipuri* de virioni:

a) virioni fără genom și fără înveliș (capside goale);

b) virioni alcătuiți din capsidă și genom, dar fără înveliș;

c) virioni maturi, ce conțin toate componentele structurale.

Virusurile acestei familii au o morfologie unitară, dar se deosebesc prin proprietățile biologice.

În funcție de spectrul de gazdă, de durata ciclului de multiplicare, de efectele citopatice pe care le produc, herpesvirusurile au fost divizate în trei subfamilii; α, β și γ.

Reprezentanții subfamiliei *Alfaherpesvirinae* au un spectru de gazdă foarte îngust. Ciclul de multiplicare este scurt și litic. Sunt neurotrope și produc infecții latente, în special în ganglionii senzitivi (HSV 1, HSV 2, virusul varicella zoster – VZV).

Subfamilia *Betaherpesvirinae* cuprinde virusuri cu spectru îngust de gazdă, iar ciclul de multiplicare este lung. *In vitro*, frecvent, produc infecții de tip echilibrat, deoarece se multiplică cu o rată scăzută și celulele rămân viabile (virusul citomegalic – CMV, HHV 6 și HHV 7).

Reprezentanții subfamiliei *Gamaherpesvirinae* produc maladii limfoproliferative la gazdele naturale. Sunt specifice pentru limfocitele T sau B, dar ciclul de multiplicare se blochează în mod frecvent și infecția devine latentă (virusul Epstein-Barr). Calificativul de "virusuri limfotrope" nu este adecvat, deoarece limfocitele sunt semipermisive.

Genomul herpesvirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, împachetată sub forma unui *toroid*, pe un ax proteic. Capetele moleculei sunt probabil, în strânsă proximitate, deoarece se circularizează rapid după ce genomul ajunge în nucleul celulei infectate. Molecula conține 125–140 kbp și prezintă secvențe repetate în ordine inversată sau directă, la extremități sau la interior, care delimitează secvențe codificatoare unice: *L* (*L*arge) și *S* (*S*mall). Secvențele unice *L* și *S* se pot inversa una față de cealaltă și produc patru *izomeri* lineari, notați cu *P* (Prototip), *IL* (inversia secvenței L), *IS* (inversia secvenței S) și *ISL* (inversia ambelor secvențe).

La unele herpesvirusuri, genomul constă dintr-o secvență unică, flancată de secvențe repetate în ordine directă.

Numărul genelor identificate prin analiza de secvențiere variază între 70 (la HSV I) și 200 (la CMV). Genele se denumesc cu prefixul segmentului genomic, UL (unique long) sau US (unique short) în care sunt localizate și se numerotează secvențial. Numărul mare de gene asigură desfășurarea ciclului de multiplicare în condițiile variate oferite de substratul celular. Totuși, circa jumătate din genele HSV I par a fi neesențiale, deoarece pot fi clivate fără să influențeze multiplicarea virusului *in vitro*.

Virionul conține *poliamine* – spermidina și spermina – (40–70 000 molecule/virion), cu rolul de a neutraliza grupările acide ale ADN, creind astfel condiții favorabile plierii moleculei de ADN în interiorul capsidei. Poliaminele par a fi strâns asociate moleculei de ADN.

Lipidele învelișului viral sunt dobândite în celula gazdă.

Ciclul de multiplicare

După atașare, virionul se leagă la resturile de *heparan-sulfat** ale proteoglicanilor membranari, învelișul *fuzionează* cu membrana plasmatică. *Glicoproteina C se leagă* cu un receptor celular, iar glicoproteinele B, D, H, K și L sunt necesare pentru fuziunea învelișului viral cu membrana celulei (glicoproteine *Hve* = *h*erpes *v*irus *e*ntry).

* Heparan-sulfatul este un proteoglican, o macromoleculă alcătuită dintr-o regiune centrală proteică, pe care se leagă covalent catene laterale de glicozaminoglicani, formând un monomer proteoglicanic. Mai mulți monomeri se leagă prin intermediul componentei proteice, de o moleculă lungă de acid hialuronic. Glicozaminoglicanii (MPZ acide) sunt polizaharide ce conțin unități dizaharidice înalt repetitive.

Nucleocapsida este transportată pe calea microtubulilor până la porii nucleari, la nivelul cărora ADN genomic este eliberat *în nucleu,* unde se circularizează, se asociază cu histonele celulare și este transcris în mesagerii specifici pe toată durata infecției productive. Transcrierea este catalizată de *ARN-polimeraza II celulară*, cu participarea factorilor virali. Cele mai multe virusuri ADN codifică proteinele pe ambele catene și de aceea catenele nu sunt pozitive sau negative. *Mesagerii sunt bonetați, metilați și poliadenilați de enzime codificate de virus.*

Proteinele virale îndeplinesc funcții specifice în ciclul de multiplicare: unele inhibă sinteza macromoleculelor celulare (ADN, ARN, proteine), altele au rol în sinteza ADN viral sau rol reglator.

Complexitatea structurală și genetică a acestor virusuri, impune acțiunea unor mecanisme reglatoare complexe. Genele sunt grupate funcțional, în raport cu momentul transcrierii. Expresia genelor este reglată și ordonată secvențial într-o *cascadă progresivă* de complexitate crescândă: α (IE-immediate early), β (E-early), γ (L-late).

Exprimarea genelor timpurii este necesară pentru expresia celorlalte gene virale:

– în stadiul *imediat timpuriu* al ciclului infecțios sunt exprimate 5 gene (α), în absența sintezei proteice. Transcrierea lor este activată de proteina nucleară α-TIF (*f*actorul de *i*nducere a *t*ranscrierii), care mediază interacția ARN-pol II celulare, cu ADN viral. Expresia genelor IE orientează ciclul de multiplicare spre evoluția litică. Toate codifică factori de transcriere, cu rol în comutarea la transcrierea genelor E și L;

– proteinele codificate de genele α activează genele *β* (programul timpuriu). Multe proteine ale programelor α și β sunt enzime sau proteine asociate ADN. *Genele β* codifică sinteza unui set de 7 enzime implicate în metabolismul acizilor nucleici (ribonucleotid-reductaza, timidin-kinaza, timidilat-sintetaza, DN-aza alcalină) și în replicarea ADN genomic (ADN-polimeraza, helicaza, primaza), care nu par a fi esențiale pentru multiplicarea virală, deoarece celula posedă astfel de enzime.

Timidin-kinaza are un spectru de activitate mai larg decât al enzimei omologe din celulă, deoarece fosforilează nu numai dezoxipirimidinele, ci şi purinele (adenina, guanina) legate de pentoze, precum şi o varietate de *analogi ai nucleozidelor* care nu sunt fosforilaţi eficient de kinazele celulare.

Ribonucleotid-reductaza reduce ribonucleotidele la dezoxiribonucleotide, creind un substrat de rezervă pentru sinteza ADN;

Enzimele nu sunt necesare pentru multiplicarea virusului în celulele care se divid cu o rată crescută, deoarece enzimele celulare suplinesc pe cele virale, dar sunt importante pentru multiplicarea virusului în celulele care nu se divid sau în cele menţinute la temperatură nepermisivă (39,5°).

Rata maximă a sintezei proteinelor β este la 5–7 ore după infecţie. După acumularea unor cantităţi suficiente, începe replicarea ADN.

Replicarea ADN reprezintă un eveniment central în ciclul de multiplicare virală. Rata înaltă a replicării ADN orientează celula, ireversibil spre infecţia productivă, care poate duce la liza celulei.

Herpesvirusurile codifică un număr mare de enzime implicate în sinteza ADN.

Marcajul în puls* arată că moleculelor replicate le lipsesc capetele libere, ceea ce semnifică faptul că ADN se replică prin intermediul unor molecule circulare sau al unor concatemeri lineari în conexiune cap-coadă (vezi capitolul Multiplicarea virusurilor).

Altă dovadă că moleculele noi au dimensiuni mari este adusă de experienţele cu precursori marcaţi: moleculele marcate sedimentează mult mai repede decât moleculele dublu-catenare de dimensiuni obişnuite.

* Principiul metodologic al marcării în puls: proba biologică este incubată în "mediul cald" ce conţine un precursor radioactiv (timidina marcată cu tritiu – H^3), un interval scurt de timp (fracţiuni de secundă), după care este transferată în "mediul rece".

La începutul intervalului de sinteză, în celula infectată se găsesc molecule lineare şi circulare de ADN viral. Cel puţin în faza tardivă a ciclului infecţios, ADN se replică după mecanismul "cercului rotativ" şi se formează concatemeri care sunt clivaţi în molecule de dimensiunea genomului, ce vor fi împachetate în capside.

După replicarea ADN, expresia genelor timpurii este redusă semnificativ sau stopată, dar este activată transcrierea genelor programului tardiv (γ), care codifică *peste 30* de proteine structurale diferite (proteinele capsidei, proteinele asociate ADN).

Proteinele virale se sintetizează pe poliribosomii liberi sau asociaţi reticulului endoplasmic şi sunt prelucrate prin clivare, fosforilare, glicozilare şi sulfatare.

Asamblarea. Glicoproteinele virale sunt sintetizate în cisternele reg şi transportate în cisternele Golgi. Alte proteine structurale se acumulează în nucleu, unde se asamblează precapsidele (fig. 416). Precapsida este mai rotundă decât capsida matură şi se asamblează în jurul proteinei de cofraj. ADN interacţionează cu proteinele specifice, este împachetat în precapsidă pe la un vârf al icozaedrului şi apoi este secţionat din concatemerii genomici. În timpul împachetării ADN, proteinele de eşafodaj sunt îndepărtate de o protează virală. Cele două procese sunt strâns legate. Clivarea se produce la o secvenţă cu rol de semnal de împachetare, la joncţiunea a două copii ale genomului. Nu s-au identificat proteinele cu rol de clivare şi împachetare a genomului.

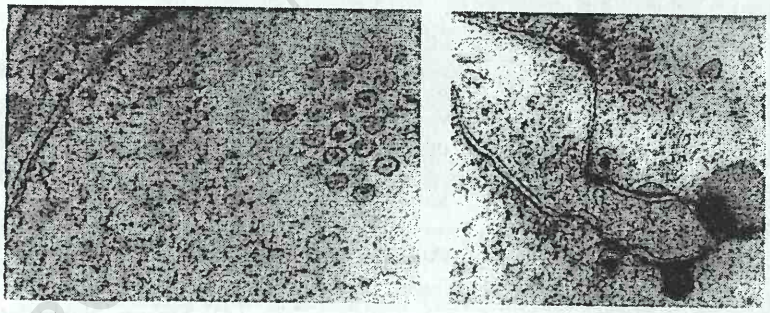


Fig. 416. Nucleocapside de HSV-1 în nucleu (stânga, 96.000). Virionii herpetici se învelesc la contactul cu membrana nucleară internă (dreapta), x 120.000 (original).

Proteinele tegumentului migrează în nucleu şi se concentrează în arii distincte sub membrana nucleară. În fazele târzii ale ciclului infecţios, semnul distinctiv este apariţia *membranelor nucleare*

reduplicate (zone groase, concave sau convexe). Învelişul viral se formează la nivelul acestor zone. Deoarece virionii nu conţin cantităţi detectabile de proteine membranare, este probabil că zonele îngroşate reprezintă agregări de proteine virale, cu următoarea distribuţie: glicoproteinele învelişului glicozilate în cisternele Golgi se localizează pe membrana externă, iar proteinele tegumentului, în membrana internă. Nu se cunoaşte mecanismul încorporării lor în membranele nucleare.

Glicoproteinele virale sunt transportate şi la nivelul membranei plasmatice şi celula infectată devine ţinta răspunsului imun.

Învelirea virionilor are loc la nivelul membranei nucleare (fig. 416). Capsidele virale care au încorporat ADN genomic se ataşează de lamela internă modificată a membranei nucleare şi se învelesc. Cele goale rămân nude, iar cele care conţin ADN mai scurt decât genomul standard sunt reţinute în nucleu. Situsul învelirii este lamela internă a membranei nucleare, unde procesul este foarte rapid. Virionii pierd învelişul la trecerea prin membrana nucleară externă în citoplasmă şi dobândesc învelişul final în veziculele derivate din cisternele Golgi. Învelirea se produce şi în citoplasmă, deoarece se observă capside juxtapuse membranelor plasmatice. Cele mai multe proteine ale tegumentului, sunt dobândite în citoplasmă, iar altele, probabil în nucleu.

Virionii maturi sunt transportaţi în vezicule derivate din reticulul endoplasmic neted, până la contactul cu membrana citoplasmatică, unde fuzionează şi îi eliberează la suprafaţa celulei (fig. 417, 418).

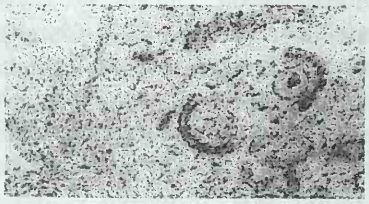


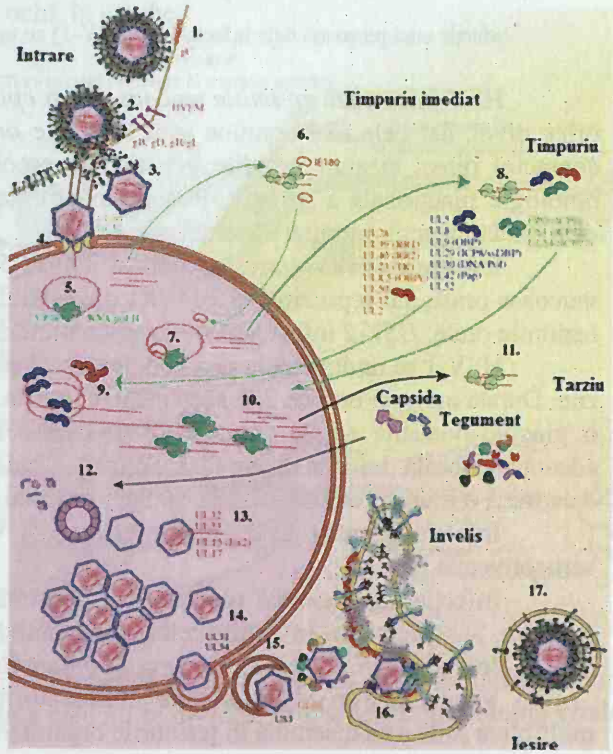
Fig. 417. Învelirea HSV în citoplasmă cu membrane ale cisternelor Golgi, x 120.000 (original).

Fig. 418. În citoplasmă, virionii sunt transportaţi în vezicule derivate din cisternele reticulului endoplasmic (stânga) şi sunt eliberaţi la suprafaţa celulei (dreapta, x 115.000, original).

În celulele permisive, *in vitro*, ciclul multiplicării virale durează 18–20 de ore.

Virionii înveliţi infecţioşi pot rămâne asociaţi cu celula şi se răspândesc în alte celule prin procesul de fuziune mediat de virus sau se eliberează din celulă şi reiau ciclul (fig. 419).

Fig. 419. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a unui α-herpesvirus. 1. Virusul se leagă de receptorul suprafeţei celulare (glpr C învelişului cu heparan-sulfatul celular). 2. Treptele ulterioare ale pătrunderii în celulă necesită alte glpr de înveliş (D, B, H, L). 3. După fuziunea peplosului cu membrana celulei, proteinele capsidei şi tegumentului sunt eliberate în celulă. Proteinele tegumentului preiau controlul aparatului celular de sinteză proteică. 4. Capsida şi proteinele tegumentului sunt transportate de către microtubuli, la nucleu. 5. Proteina VP_{16} a tegumentului se localizează în nucleu independent de capsidă şi activează transcrierea proteinei imediat timpurii (IE_{180}), catalizată de ARN-pol II. 6. Proteina IE_{180} este transportată în nucleu. 7. In nucleu, IE_{180} activează transcrierea genelor timpurii. 8. Genele programului timpuriu codifică 2 categorii de proteine: 15 proteine sunt implicate în sinteza ADN. 9. 7 dintre proteinele timpurii sunt esenţiale pentru replicarea ADN viral, prin mecanismul cercului rotativ. 10. A II-a categorie sunt 3 proteine timpurii cu rol de activatori ai transcrierii. 11. Iniţierea sintezei ADN semnifică intrarea în stadiul tardiv al ciclului de multiplicare şi sinteza proteinelor tardive. 12. Proteinele capsidale sunt transportate în nucleu şi se asamblează în jurul unui eşafod (cofraj) proteic. 13. Capsida matură este alcătuită din 5 tipuri de proteine. Una dintre ele acţionează ca situs de intrare a ADN genomic în capsidă. 14. În timpul învelirii primare, nucleocapsida înmugureşte din nucleu şi intră temporar în spaţiul dintre cele două membrane. 15, 16. Nucleocapsida pierde învelişul primar, se asociază cu proteinele tegumentului şi se învelește final prin înmugurire în reţeaua transgolgiană. 17. Virionii sunt transportaţi spre suprafaţa celulei, într-o veziculă derivată din compartimentul de învelire (după Pomeranz şi colab., 2005).



ECP. Cele mai timpurii modificări, după infecția productivă, se observă la nivelul nucleolului: se mărește prin distribuția laxă a componentelor, se deplasează spre membrana nucleară, se dezagregă sau se fragmentează (fig. 420). Cromatina se desprinde din situsurile de inserție pe matrice, nucleul se deformează și devine polilobat. Celulele se rotunjesc și devin reciproc aderente, dar unele mutante determină fuziunea celulară și formarea policariocitelor.

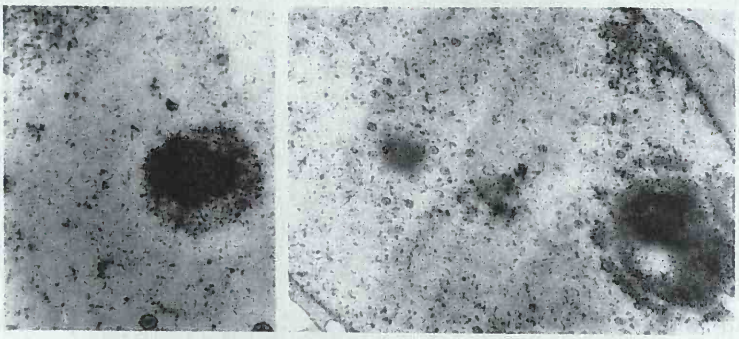


Fig. 420. ECP indus de virusurile herpetice în celulele HEp-2: segregarea (stânga) și fragmentarea nucleolului (dreapta), x 80000 (original).

Modificările metabolice ale celulei infectate se produc în două etape:

- sub acțiunea proteinelor structurale ale virionului infecțios. Proteina U_{L41} din structura virionului pare să rămână în citoplasmă unde produce *dezagregarea poliribosomilor și degradarea ARN celular*. Astfel rata sintezei proteinelor scade rapid;
- sub acțiunea proteinelor virale sintetizate *de novo*. Se produce stoparea rapidă a biosintezei macromoleculelor specifice celulei: sinteza ADN și a ARNr este blocată de proteine ale programului timpuriu.

Celulele infectate cu virusuri herpetice se lizează.

În anumite tipuri celulare, genele IE nu sunt transcrise și infecția evoluează sub forma latenței. În timpul latenței expresia genelor virale este minimă și genomul viral nu se replică.

Patogenitate

Infecția *primară** (prima experiență a organismului sensibil cu HSV-1 sau 2) este inițiată prin diseminarea virusului dintr-un proces infecțios activ.

* Infecția unei persoane deja infectată (cu HSV-1) cu un alt tip de virus (HSV-2) este denumită infecție inițială.

HSV infectează *epiteliile mucoaselor* și *epiteliul tegumentar* lezat. Infecția se poate produce la orice nivel, dar cele mai comune sunt infecțiile *orale* și *genitale*. HSV-1 și HSV-2 se transmit prin contactul direct și sunt înrudite genetic: au omologie extinsă a nucleotidelor și un grad înalt de omologie funcțională a genelor. Recombinanții stabili se generează ușor în cultură mixtă (dar nu *in vivo*) și dau reacții imunitare încrucișate.

Infecția cu HSV-l are loc între 6 luni și 5 ani de la naștere. HSV-1 infectează predominant mucoasa orală, dar reprezintă și 30–50% din totalul izolatelor genitale, iar HSV-2 s-a izolat rareori din leziunile orale. *HSV-2* infectează mucoasa genitală, probabil, la începutul vieții sexuale.

HSV-1 se multiplică la poarta de intrare. Perioada de incubație este de 2–12 zile, cu o medie de 4 zile. Durata infecției este de 2–3 săptămâni, cu grade diferite de severitate. Infecția *orală primară* produce o gingivo-stomatită acută, cu ulcerații dureroase ale mucoasei bucale, însoțită frecvent de febră și adenopatie locală. Infecția nu are fază viremică, fiind limitată la *epiteliul și la neuronii senzitivi regionali* și determină o leziune caracteristică la nivelul joncțiunii dintre tegument și mucoasa labială.

Infecția primară este autolimitată și se vindecă în 2–3 săptămâni, timp în care are loc seroconversia.

Infecția *tegumentară* rezultă din contaminarea leziunii cu virus din *salivă* sau din *secrețiile genitale*. Sunt frecvente infecțiile celor care practică sporturi de contact: lupte, rugby.

Infecția *oculară* produce *cherato-conjunctivită* uni- sau bilaterală.

Virulența este o proprietate multifactorială care reflectă capacitatea unui virus de a se multiplica și de a se disemina în țesuturile organismului, în competiție directă cu efectorii RI.

Virulența virusurilor herpetice se evaluează în raport cu capacitatea de a se multiplica și de a produce *encefalită, după inoculare intracerebrală* la maimuță. În infecțiile umane, pe fondul unei reactivități imunitare normale, encefalita este foarte rară. Virusurile herpetice invadează SNC, probabil prin infecția unui nerv cranian.

Tulpinile de virus herpetic diferă prin gradul de virulență și de *neuroinvazivitate*. HSV este transportat în nevrax prin filetele nervilor. Invazia *SNC* este rară și se manifestă ca o *encefalită*, caracterizată prin infecția citolitică, în primul rând a neuronilor din *lobii temporali*. Toate grupele de vârstă au sensibilitate egală la invazia herpetică a SNC. Netratată, encefalita produce mortalitate de peste 70%. După vindecare rămân sechele. Encefalita poate fi, în proporții egale, consecutivă *infecției primare* sau *recurenței*. Nu se cunoaște mecanismul invaziei SNC și nici factorii predispozanți. Mortalitatea este înaltă, iar vindecarea este însoțită de sechele.

Herpesul *neonatal* este produs de HSV-2 (frecvența este de 1/5000). Infecția are loc *in utero*, în timpul sau după naștere. Sursa de infecție este organismul matern, prin contactul fătului în timpul nașterii cu leziunile herpetice ale tractului genital. Nașterea prin cezariană elimină riscul infecției. Herpesul neonatal poate fi dobândit postnatal prin contactul cu persoane care elimină virus. Majoritatea infecțiilor neonatale sunt produse de HSV-2. Infecția neonatală este totdeauna simptomatică și produce 3 tipuri de entități clinice : leziuni localizate la nivelul tegumentului, ochiului și mucoasei bucale; encefalită; infecție generalizată (plămân, ficat, SNC, tegmument, glande suprarenale). Mortalitatea infecției neonatale, netratată, este de 50%.

Dacă virusul vine în contact cu terminațiile nervoase, multiplicarea periferică inițială în celulele epiteliale ale mucoasei nu este necesară. Indiferent de situsul infecției sau de tipul de virus, HSV pătrunde în *terminațiile nervoase senzitive* și este transportat spre pericarion. Nucleocapsidele traversează joncțiunea sinaptică a celulei epiteliale, intră în terminațiile senzitive și sunt transportate prin flux axonal *retrograd*, spre corpii neuronali ai ganglionilor senzitivi regionali: ganglionul *Gasser*, ganglionul *nodos* al vagului și respectiv ganglionii *sacrali*. Transportul este mediat de *microtubuli*. Medicamentele care dezorganizează microtubulii inhibă transportul virusului de la periferie spre neuron.

În neuroni, virusul urmează una dintre cele două modalități de infecție (fig. 421):

- *infecție productivă*, cu eliberarea virusului progen și posibila diseminare în țesutul nervos, consecința fiind *encefalita*;
- *o infecție latentă*, cu transcriere genică limitată, fără producerea virusului matur.

Bazele moleculare ale latenței s-au studiat în infecții experimentale pe șoarece, cobai, iepure. Virusul se inoculează în țesutul plantar, în ochi, în ureche.

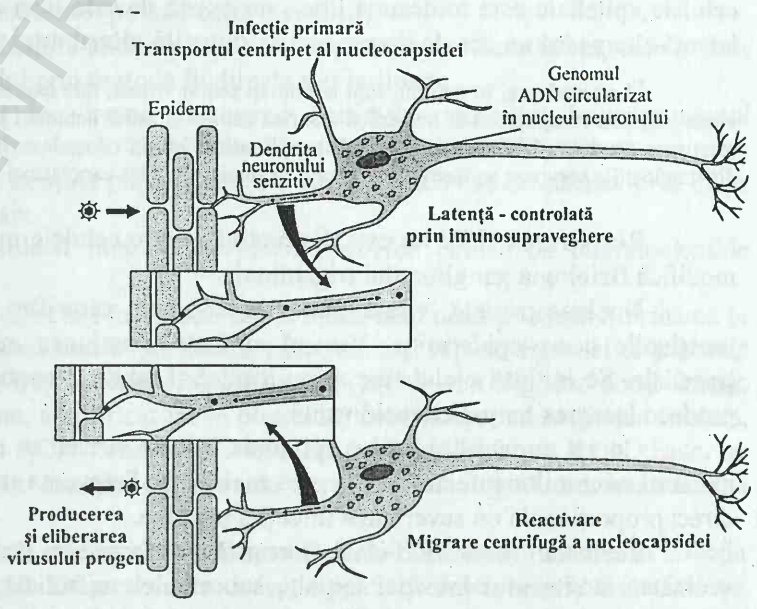


Fig. 421. Alternanța fazei de infecție productivă în celulele epidermei și a celei de latență în neuronii senzitivi. În infecția primară, virusul se atașează și penetrează terminațiile senzitive locale. Nucleocapsidele și proteinele tegu-mentului sunt transportate retrograd prin terminația periferică, de-a lungul microtubulilor până la pericarion, unde virusul persistă sub forma ADN circularizat în stare fizic autonomă (analog plasmidelor). În faza de latență, în și pe celula infectată nu se detectează antigene virale și nu se asamblează virioni progeni. Sistemul imunitar nu recunoaște neuronii infectați latent (modificat, după M. Forsgren și colab., 2009).

Latența. Proprietatea distinctă a virusurilor herpetice este capacitatea de a produce *infecții latente* în neuroni, pentru tot restul vieții. În celulele care nu se divid, nu sunt necesare proteine virale

pentru menținerea latenței. Latența este consecința stopării ciclului de multiplicare. Cascada expresiei genice este stopată, transcrierea fiind limitată la un set restrâns de gene ale programului timpuriu. Sunt transcrise numai copiile LATs (*L*atency *A*ssociated *T*ranscripts), care asigură replicarea limitată a genomului. În neuroni, virusul persistă sub forma *genomului viral în copii multiple cu conformație circulară,* deosebită de conformația lineară în virion. Una dintre proteinele LATs inhibă apoptoza neuronului infectat latent cu HSV-1.

Metoda hibridării *in situ* a evidențiat un număr mic de copii genomice în neuronii ganglionului trigeminal: circa 10% din celulele unui ganglion infectat latent conțin 1–10 molecule genomice, pentru că ADN viral este replicat cu o rată scăzută, prin mecanisme virale și celulare. Nu s-au detectat proteine virale. În perioada latenței, nu se asamblează virus progen, cu excepția unor episoade intermitente. Latența este comparabilă cu faza lizogenică a fagului λ. Replicarea genomului cu o rată scăzută este importantă pentru menținerea latenței și permite reactivarea. Latența virusurilor herpetice este posibilă numai în neuron, deoarece este o celulă nepermisivă. *In vitro*, neuronii ganglionari infectați devin permisivi pentru multiplicarea virusului.

În infecția oro-facială, HSV infectează nervul și ganglionul trigeminal, iar în infecția genitală, HSV infectează nervii și ganglionii lombo-sacrali.

Majoritatea populației adulte este infectată *latent* cu HSV. Majoritatea celor infectați latent nu au memoria infecției primare, dar nici nu suferă leziuni recurente. O minoritate dintre cei infectați latent suferă *recurențe clinice* periodice, cu leziuni veziculare la joncțiunile mucocutanate ale cavității orale și nazale, care ulcerează, fac crustă și se vindecă în 4–7 zile.

Recurența semnifică *reactivarea virusului* latent în ganglioni, stabilirea unui focar în epiteliul oral și eliminarea în salivă. Activarea virusului latent *in vivo,* se produce sub acțiunea mai multor factori: imunosupresia, schimbări hormonale, diferite condiții de stres, expunerea la raze UV, traumatisme, medicamente ce stimulează sinteza PG. Reactivarea și reinocularea virusului în celulele epiteliale necesită ca o precondiție, multiplicarea în neuron. Se presupune că în neuronii infectați latent se produce activarea în cascadă a programului genetic α, β, γ și se asamblează nucleocapside virale, care sunt transportate centrifug prin sistemul microtubulilor până la sinapsa cu celulele epiteliale. Permisivitatea neuronilor *in vivo* este trecătoare: intervalele permisive alternează cu cele nepermisive.

Stimulii produc modificări ale fiziologiei neuronale, favorizând transcrierea genelor virale. La reactivare multiplicarea virusului este strict controlată: glicoproteinele virale nu sunt expuse pe membrana neuronului, iar neuronul ar supraviețui episoadelor de reactivare. Deși ciclul multiplicării în celulele epiteliale este totdeauna litic*, nu există dovada lizei neuronului senzitiv. În neuron, infecția latentă alternează cu cea de tip productiv, datorită alternanței stărilor fiziologice ale celulei.

* La reactivare, în neuroni sunt asamblați puțini virioni, fără expresia glicoproteinelor pe suprafața celulei. Genele virale interferă cu apoptoza și împiedică moartea celulei și astfel neuronul poate să supraviețuiască episoadelor repetate de reactivare. Studiile pe celulele cultivate ale ganglionilor rădăcinii dorsale de la embrionii umani sugerează că ieșirea virusului din terminațiile nervoase se face prin transport vezicular pe calea axoplasmei.

Reactivarea HSV nu este distructivă pentru celulele infectate latent și recurențele repetate nu modifică fiziologia ganglionului trigeminal.

Nucleocapsidele virale sunt transportate centrifug prin prelungirile nervoase până la joncțiunile neuro-epidermice. Virusul străbate joncțiunea neuro-epidermică și infectează celulele epiteliale. Se inițiază ciclul litic al multiplicării virale. Repetarea ciclului litic în celulele învecinate produce leziunea herpetică recidivantă.

Cu cât numărul celulelor epiteliale în care virusul se multiplică inițial este mai mare, cu atât numărul neuronilor infectați latent este mai mare. Frecvența reactivărilor și severitatea leziunilor este direct proporțională cu severitatea infecției primare.

Leziunea recurentă clasică constă în formarea veziculelor pline cu virus, în imediata vecinătate a situsului infecției inițiale, sub celulele epiteliale squamoase cheratinizate. Infecția este litică, iar vezicula conține un infiltrat dens de celule inflamatorii (în special mononucleare).

Probabilitatea recurențelor produse de HSV-l și HSV-2 scade cu vârsta. Recurențele genitale sunt mai frecvente.

Răspunsul imun la procesul infecţios implică o interacţiune complexă a celulelor NK, macrofagelor, limfocitelor şi a citokinelor asociate. Reacţia imună este orientată faţă de celulele infectate şi faţă de virionii liberi. În timpul infecţiei primare, multiplicarea virală este asociată cu reacţia inflamatorie nespecifică intensă. Reacţia de HSÎ este urmată de răspunsul specific al limfocitelor Tc şi de sinteza anticorpilor. La reactivare, aria leziunii este invadată de celule NK, numeroase TCD_4 care secretă citokinele specifice şi *puţine* TCD_8. Răspunsul imun este *modulat* de HSV. Celulele infectate cu HSV sunt rezistente la acţiunea litică a limfocitelor Tc, prin inhibţia expresiei moleculelor CMH I şi implicit a peptidelor virale citosolice. Deficienţa IMC poate fi asociată cu infecţia severă.

Protecţia anti-HSV este conferită de celulele TCD_8, şi de citokinele eliberate de setul CD_4Th_1. Celulele TCD_8 controlează mulplicarea HSV în neuroni printr-un mecanism mediat de *citokine* şi nu prin efect litic direct. Limfocitele T specifice recunosc Ag virale asociate cu moleculele CMH şi sunt esenţiale pentru stoparea evoluţiei procesului infecţios. Deficitul funcţional al celulelor T este asociat cu infecţii severe şi prelungite.

Serul pacienţilor ce se vindecă de infecţiile severe cu HSV poate să conţină Ac faţă de toate proteinele structurale ale virusului, dar sunt specifici în primul rând faţă de glicoproteinele de înveliş. Anticorpii anti-D sunt neutralizanţi. Anticorpii serici nu protejează faţă de reinfecţie, dar severitatea infecţiilor succesive se corelează invers cu titrul Ac. Anticorpii neutralizează virionii, iar complexele imune virion-Ac-C pot să determine creşterea ratei fagocitozei virale. Anticorpii specifici faţă de alte antigene virale nu sunt protectori, dar pot produce maladia cu CI. De aceea, pentru a fi eficient, un vaccin trebuie să inducă sinteza Ac specifici faţă de glicoproteinele de înveliş care mediază legarea virionului de receptorii celulari. În infecţia primară se sintetizează IgM, IgG, IgA. În timpul recurenţelor predomină IgG. Răspunsul imun timpuriu are specificitate de tip antigenic, iar cei tardivi reacţionează încrucişat.

Majoritatea adulţilor (70–90%) sunt seropozitivi şi se crede că poartă virusul latent. Unii fac o singură recurenţă, iar alţii au episoade recurente multiple de intensităţi variabile, în funcţie de reactivitatea IMC. Anticorpii materni sunt transferaţi pasiv la nou-născut. Între 6–24 luni este perioada sensibilităţii maxime la infecţia cu herpes. Anticorpii transplacentari nu sunt complet protectori, dar limitează amploarea infecţiei. Titrul anticorpilor anti-HSV-2 creşte după începerea activităţii sexuale.

*Diagnostic*ul infecţiei herpetice se bazează pe izolarea virusului din leziunile labiale şi genitale, pe un substrat celular sensibil. Lichidul vezicular este bogat în virus. HSV-1 şi 2 se multiplică repede în culturi fibroblastice şi epiteliale umane şi produce ECP în 1–7 zile. Celulele se rotunjesc, volumul creşte. Tulpinile proaspăt izolate produc rareori fuziuni celulare, iar cele pasate în mod repetat, *in vitro*, produc fuziuni frecvente (policariocite = sinciţii).

Microscopia optică cu UV foloseşte anticorpi specifici cuplaţi cu un fluorocrom, care permit localizarea rapidă şi specifică a virusului prin metoda IF directe sau indirecte.

Fluidul vezicular este bogat în virioni. Examenul lichidului vezicular la *microscopul electronic* prin tehnica coloraţiei negative, este o metodă rapidă pentru detectarea HSV.

În cazurile de encefalită, LCR conţine puţine particule virale şi ADN se detectează prin PCR. În acest caz virusul se cultivă din biopsie.

Pentru detectarea HSV s-a folosit metoda *hibridării probelor* clinice cu oligonucleotide marcate radioactiv sau cu enzime.

Acizii nucleici de HSV pot fi detectaţi în biopsie sau în materialul necroptic prin hibridarea *in situ*. Secţiunile tisulare incluse în parafină sunt deparafinate, rehidratate şi supuse digestiei cu *pronază K* (protează). După treapta denaturării, fragmentele de ADN marcat (proba – un oligonucleotid sintetic sau un fragment de ADN al HSV clonat, amplificat într-o plasmidă) este incubat cu secţiunea tisulară, urmată de spălare pentru îndepărtarea ADN nehibridat. ADN din probă, hibridat cu ADN tisular se evidenţiază prin metoda adecvată, în funcţie de marcajul probei (radiologică, enzimatică sau chemiluminiscenţă).

De cele mai multe ori, în clinică, evidenţierea IgG specific anti-HSV ete suficientă. În infecţia primară, IgG apare concomitent cu IgM. Diferenţa între infecţia primară şi cea recurentă se face pe baza afinităţii înalte a IgG anti-HSV.

Epidemiologie. HSV este probabil, cel mai frecvent virus în populaţia umană. Omul este singura gazdă naturală, iar infecţia latentă în ganglioni este rezervorul de virus. Virusul se transmite

prin intermediul picăturilor de salivă, numai din leziunile deschise labiale sau gingivale şi respectiv ale mucoasei vaginale în care virusul se multiplică. În faza de latenţă, virusul nu se transmite.

Vaccin. Astăzi nu există un vaccin omologat pentru profilaxia HSV. Faptul că reinfecţia este posibilă, iar restimularea răspunsului imun la o nouă recurenţă nu previne recurenţele ulterioare, a fost argumentul că vaccinarea este inutilă. Totuşi, infecţia cu HSV-1 diminuează incidenţa şi severitatea infecţiilor genitale cu HSV-2. În serul prostituatelor se găsesc anticorpi specifici, dar rolul lor protector este minim, datorită localizării speciale a virusului.

Virusul varicela zoster (VZV)

Varicela şi *zona zoster* sunt 2 sindroame clinic distincte produse de acelaşi virus.

Varicela este o denumire nepotrivită – diminutiv de la variolă – care sugerează afinitatea acestui virus cu smallpox şi cu poxvirusurile, afinitate care nu există.

Varicela este consecinţa *infecţiei primare*. Perioada de incubare este de 2 săptămâni. Este o infecţie generalizată cu exantem, a copiilor de vârstă şcolară, se transmite prin aerosoli şi este foarte contagioasă. Virusul pătrunde pe cale *respiratorie* şi se multiplică în celulele epiteliale ale *tractului respirator*, *orofaringelui* sau *conjunctivei*. De aici virusul trece în sânge şi realizează faza *viremiei primare*.

În timpul viremiei primare, VZV se diseminează prin celulele SFM, la sisteme multiple de organe, unde se multiplică în celulele endoteliale ale vaselor sanguine mici. După multiplicarea în organe, se produce *viremia secundară*.

Viremia secundară este asociată cu *erupţia eritematoasă veziculară* (rash), iniţial cu aspect macular, care evoluează repede în vezicule pline cu lichid, infiltrat cu leucocite. Veziculele fac crustă în câteva zile şi se vindecă în 2–3 săptămâni.

Erupţia are grade variate de severitate. Implicarea SNC este rară. La adulţi, infecţia este mai severă. Cea mai severă complicaţie este *pneumonia*. Femeile gravide sunt foarte sensibile la pneumonia cu varicelă.

Din celulele epiteliale, virusul infectează *terminaţiile nervoase senzitive* şi este transportat la *ganglionii senzitivi*, unde produce *infecţia latentă*.

Infecţia cu VZV fiind diseminată, latenţa se stabileşte în toţi ganglionii senzitivi. Reactivarea este indusă de imunosupresie, traumatisme etc. În ganglioni are loc multiplicarea, iar de aici virusul se diseminează prin transport axonal, într-un dermatom specific, infectează celulele epiteliale şi se multiplică productiv, cu leziunile specifice.

Patogeneza VZV este puţin cunoscută datorită dificultăţilor de cultivare şi numărului mic de modele experimentale. Virusul este abundent în leziunile tegumentare, chiar în stadiul maculo-papular, dar izvorul de infecţie şi calea de transmitere sunt puţin cunoscute. Transmiterea pe calea aerului (fără să necesite contactul direct) din leziunile tegumentare şi din leziunile orale asimptomatice, care preced leziunile tegumentare, este foarte probabilă, deoarece ADN VZV este uşor detectat prin PCR în aerul din atmosfera pacienţilor. Poarta de intrare a virusului este calea respiratorie, deşi virusul nu se izolează din tractul respirator. În erupţia de varicelă, rata de atac clinic a VZV este de 70–90% dintre indivizii sensibili.

După multiplicarea la poarta de intrare, în substrat celular necunoscut, virusul se diseminează în organele limfoide secundare, unde are loc al II-lea ciclu de multiplicare, în limfocitele T. Probabil că virusul se multiplică şi în alte ţesuturi (plămân, creier), dar infecţia acestor organe, de regulă, nu se manifestă clinic. Implicarea amplă a acestor organe produce maladii grave.

Examenul histologic al leziunilor tegumentare evidenţiază ECP: celulele infectate sunt mai mari decât cele normale şi conţin incluzii nucleare acidofile. Leziunea tegumentară se extinde şi centrul este plin cu lichid clar, care ulterior se tulbură cu infiltratul celulelor inflamatorii. Incheierea procesului infecţios este marcată de uscarea pustulelor, formarea crustei şi regenerarea epiteliului.

Latenţa. După infecţia primară, virusul rămâne latent în unul sau mai mulţi ganglioni ai rădăcinilor dorsale ale nervilor spinali şi cranieni. Ganglionii trigeminali şi toracici sunt cel mai adesea implicaţi, dar şi alţi ganglioni pot să conţină ADN VZV. În timpul latenţei, ADN viral persistă sub formă episomală, circularizat. În timpul latenţei, majoritatea genelor sunt inactive. Virusul se reactivează în ganglioni şi progresează centrifug, spre periferie, prin fibrele senzitive, pentru a produce

leziuni tegumentare tipice de herpes zoster, limitate la dermatomul inervat de filetele neuronilor ganglionului sediu al latenței. Reactivarea virusului este asociată cu modificări inflamatorii intense în ganglionul implicat, reflectată în durerea severă ce însoțește multiplicarea virală. Reactivarea VZV este cunoscută sub denumirea de *zona zoster*. Nu se cunosc cauzele care determină reactivarea virusului latent.

Zona zoster (ZZ) este o maladie infecțioasă endemică, ce apare la persoanele mai vârstnice, imunocompromise și se caracterizează printr-o erupție veziculară dureroasă, limitată la *dermatomul* inervat de ganglionul în care s-a reactivat VZV. Denumirea de *zona zoster* reflectă manifestările clinice ale recurenței, limitate la o zonă tegumentară bine delimitată.

ZZ nu se corelează cu expunerea la virusul exogen. Ea pare a fi o manifestare *secundară*, datorată reactivării virusului varicela care a rămas latent. Reactivarea virusului varicelei este asociată cu *declinul imunității generale* și nu este indusă de factorii de stres care activează HSV. Reactivarea și recurențele iau forma *erupției unilaterale*, limitată la un *singur dermatom*, adică aria tegumentară inervată de un singur ganglion senzitiv. Reactivarea este asociată cu diseminarea virusului în tot dermatomul inervat de neuronii ganglionului în care s-a produs activarea și duce la *leziuni necrotice* în dermatom.

VZV infectează numai omul. Rezervorul natural este virusul latent din ganglionii senzitivi.

Nevralgia post-herpetică atât de caracteristică reactivării VZV poate să reflecte distrugerea țesutului nervos.

Probabilitatea recurențelor VZV crește cu vârsta.

Diagnosticul infecției cu VZV se pune prin examenul la microscopul electronic a lichidului recoltat din veziculele timpurii de varicelă sau de zona zoster, în care se observă particule virale.

Frotiul din raclajul din profunzimea leziunii, colorat cu metoda Papanicolau sau cu albastru de metilen, relevă prezența celulelor gigante multinucleate. Efectul citopatic al VZV nu se distinge de HSV. De aceea, pentru identificare, citologia se asociază cu metoda imunofluorescenței.

β-*herpesvirusuri* – CMV (HHV5), HH6 și HH7

Virusul citomegalic (CMV = HHV5) este denumit virusul glandelor salivare. Infecția cu CMV este comună (endemică) la toate populațiile umane (90%) și este inaparentă chiar la nou-născut. 90% din populația adultă este infectată. Rareori este asociată cu manifestări clinice la gazdele cu reactivitate imunitară normală, datorită controlului de către celulele TCD_8^+.

CMV are un spectru îngust de gazdă: s-a izolat de la șoarece, cobai, primate. La gazdele sensibile este diseminat în toate sistemele de organe. Se crede că CMV produce o infecție persistentă pentru toată durata vieții, cu rezervor de celule infectate latent și celule infectate persistent, care eliberează intermitent virus infecțios, dar nu există dovezi că infecția latentă poate fi reactivată la o infecție dectectabilă clinic. Numeroase tipuri celulare sunt infectate în majoritatea sistemelor de organe.

In vitro, CMV infectează un număr limitat de tipuri celulare, se multiplică lent, adeseori cu formarea celulelor gigante (fig. 422). Receptorul pentru HCMV pare a fi molecula CMH I.

CMV are specificitate de gazdă. Chiar la gazda naturală, unele celule sunt mai sensibile decât altele. Unele celule nu sunt lizate de infecție, sunt infectate persistent și au rol important în păstrarea virusului ca agent infecțios.

HCMV produce circa 8% din cazurile de mononucleoză infecțioasă, iar la persoanele imunodeficitare, CMV este un patogen semnificativ, producând morbiditate și mortalitate. Severitatea infecției este proporțională cu gradul imunosupresiei.

CMV este cauza cea mai frecventă a deficiențelor nou-născuților: surditate, retardare mintală. La pacienții SIDA produce retinită și orbire.

In vivo, manifestările clinice apar lent. Multiplicarea lentă se datorează faptului că proteinele virale se sintetizează în cantități mici și necesită un interval lung pentru a se acumula la un nivel suficient.

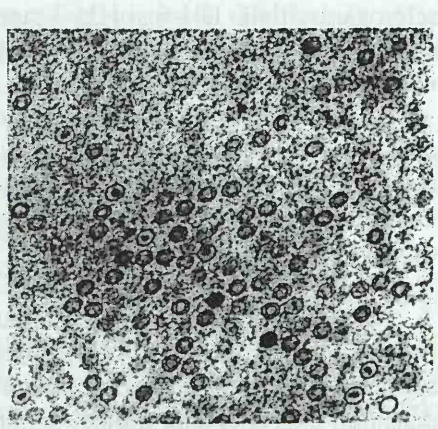


Fig. 422. Nucleocapside CMV în nucleul celulelor HEp-2, x 80.000 (original).

Grupele de persoane cu risc înalt de infecție:

- CMV traversează placenta. Infecția *in utero* produce malformații congenitale;
- receptorii de alografe supuși tratamentului imunosupresiv, fie datorită reactivării virusurilor latente endogene, fie datorită infecției cu virusul din organul transplantat;
- pacienții SIDA, unde rata infecției cu CMV atinge 95%, fiind cea mai comună infecție oportunistă.

Gazdele imunocompromise fac infecții pulmonare, hepatită, nefrită, encefalită sau/și o incidență crescută a infecțiilor bacteriene și fungice.

HCMV pare a fi în stare latentă în celulele precursoare ale liniei mieloide și se reactivează sub acțiunea citokinelor proinflamatorii.

După infecția primară, virusul este eliminat prin urină, în secrețiile genitale (inclusiv în lichidul spermatic), în salivă, în secreția lactată, dar este detectabil în special în leucocite.

Epidemiologie. Virusul se transmite pe orizontală prin contactul cu fluidele pozitive pentru virus și necesită contactul direct cu materialul infecțios: urină, salivă, lacrimi, spermă, secrețiile cervixului uterin și în secreția lactată, fluide în care este eliberat pentru perioade lungi de timp. Virusul se transmite cu ușurință prin aerosolii salivari în condiții de mare aglomerație, iar transmiterea pe cale sexuală este condiționată de prezența virusului în spermă și în secrețiile cervixului. Virusul este transmis prin transfuzia de sânge și prin transplantul de organe. Transmiterea pe verticală are loc transplacentar (în timpul sarcinii), perinatal sau prin laptele matern. Transmiterea placentară este caracteristică β-herpesvirusurilor, dar nu celor α sau γ.

Patogeneza. Infecția este litică și de lungă durată, deoarece imunitatea nu controlează multiplicarea și diseminarea virusului. CMV exercită potențialul patogenic și prin mecanisme nelitice: modulează funcțiile normale ale celulei gazdă prin expresia limitată a genomului său, sau influențează funcțiile celulare prin inducția sintezei citokinelor. CMV produce mononucleoza infecțioasă, febră, hepatita post-transfuzie datorită transmiterii virusului de la donor, maladii reumatologice, malignități ale tractului urogenital și probabil chiar în dezvoltarea aterosclerozei coronare.

CMV infectează aproape toate sistemele de organe: histologic, apar celule refractare mari (citomegalic) cu incluzii nucleare în formă de 'ochi de bufniță'.

Diagnosticul constă în evidențierea agentului (virus, proteine virale, acizi nucleici) în fluide și țesuturi sau răspunsul serologic al pacienților.

Virusul se evidențiază prin cultivare pe substrat permisiv: fibroblaste umane primare.

Pe lângă virionii infecțioși, celulele infectate cu HCMV produc alte 2 tipuri de particule:

- particule neînvelite, nu conțin genom, dar conțin proteinele tegumentului și capsidei ;
- corpi denși, acestea fiind proteine ale tegumentului, învelite, fără capsidă și genom.

HH-6 și *HH-7* – roseolovirusuri – infectează aproape toți copiii (95%) și produc febra infantilă cu erupție tegumentară asemănătoare rujeolei, la circa 10%. Cele 2 virusuri produc infecții benigne și autolimitate, dar la imunocompromiși (pacienții SIDA și cei cu alografă) infecția primară sau reactivată este gravă. HH-6 pare a fi asociat cu maladii neurologice: epilepsie, encefalită și scleroză multiplă. HH-6 și HH-7 sunt limfotrope și neurotrope: infectează și rămân latente în celulele stem leucocitare și în neuroni. Ciclul multiplicării cu liza celulei, are loc în limfocitele TCD_4, atât *in vitro*, cât și *in vivo*.

HH-6 s-a izolat de la pacienții SIDA, cu maladie limfoproliferativă. Are tropism pentru celulele T și este înrudit serologic cu CMV. S-au identificat 2 variante: A (rol etiologic necunoscut) și B (agentul exantemului febril subitum – roseola – copilăriei). Contaminarea cu HH-6 începe timpuriu în copilărie și atinge 90% la populația adultă. Virusul persistă latent în glandele salivare și se transmite de la mamă la copil, prin salivă.

HH-7 s-a izolat din celulele CD_4 de la indivizi normali.

HH-6 și HH-7 au efect modulator direct și indirect asupra sistemului imunitar, ce favorizează persistența în limfocitele TCD_4. Efectele directe constau în liza limfocitelor TCD_4 infectate și, sub acțiunea citokinelor, în apoptoza limfocitelor învecinate. Efectele indirecte sunt consecința modulării densității expresiei unor molecule implicate în activarea răspunsului imun: CD_3, CD_4.

HH-8 este co-factorul decisiv al inducției sarcomului Kaposi, prin dereglarea producerii citokinelor și hormonilor.

γ-herpesvirusuri. Virusul Epstein-Barr (*Lymphocryptovirus*)

EBV a fost descris de D. Burkitt (1964) într-o tumoră cu apariție restrânsă la copiii din Africa. Este un herpesvirus limfotropic, deși limfocitele sunt nepermisive pentru multiplicare, cu potențial oncogen. S-au definit 2 linii de EBV: 1 și 2, fără distribuție geografică specifică. Cele 2 subtipuri au omologie extinsă a genelor ce codifică antigenele nucleare. *In vitro*, EBV1 imortalizează mai eficient limfocitele B.

Gazda naturală a EBV este omul și câteva primate: gibonul, maimuța bufniță.

La om, EBV infectează preferențial limfocitele B, prin receptorul CR_2 ($CD21^*$). O moleculă asemănătoare pe celulele epiteliului squamos orofaringian poate să medieze infecția productivă a acestor celule, care poate să continue la unii indivizi, ca o infecție cronică, adică multiplicare urmată de liză celulară, cu eliberarea virusului și infecția altor celule. Epiteliile sunt situsuri privilegiate, favorizante ale persistenței virale, datorită accesului limitat al limfocitelor T. EBV infectează celulele B din criptele tonsilare, urmată de latență cu expresia limitată a genelor și imortalizarea celulei latente, activarea celulei și proliferarea, amplificând numărul de celule infectate la poarta de intrare. Limfoblastele B trec în sângele periferic și se diseminează sistemic. Prezența lor în circulație stimulează răspunsul celulelor T. Infecția latentă este compatibilă cu diviziunea celulei.

CD_{21} (sau CR_2, adică receptorul pentru complement, de tip 2, ce leagă C_{3d}) este o *glicoproteină membranară*. Receptorul CD_{21} are rol în activarea normală a limfocitelor B. În timpul activării cascadei C, C_3 este clivat în C_{3b}, care se leagă de complexele Ag-Ac. C_{3b} este prelucrat proteolitic și rezultă C_{3d}. C_{3d} atașat de complexul Ag-Ac, se fixează la limfocitul B, pe calea CR_2. C_{3d} este ligandul natural pentru CR_2.

Genomul viral nu se integrează în ADN celular, dar persistă sub forma unui episom circular închis, prin legarea covalentă a secvențelor terminale repetate. Curând după infecție, episomul se replică și rezultă copii multiple, care ulterior se replică odată cu ADN celular, cu distribuție egală în cele 2 celule fiice, permițând ca numărul de copii de ADN viral să rămână constant. ADN episomal poate fi activat, virusul trece în ciclul litic, cu liza celulei și formarea virusului progen.

Infecția primară, în timpul copilăriei, este de cele mai multe ori subclinică, urmată de starea de purtător pentru toată viața, caracterizată printr-un echilibru între nivelul infecției și intensitatea RIMH și RIMC.

La copii, EBV infectează latent limfocitele B din tonsile, unde epiteliul de suprafață este discontinuu și virusul are acces direct la limfocite. Infecția inițială a celulelor B, predominant neproductivă, este datorată expresiei genelor de latență, urmată de activare celulară și proliferare, amplificând populația de celule infectate la poarta de intrare.

În limfocitul B infectat latent, ADN viral persistă sub forma unui număr constant de molecule genomice circulare închise. *In vitro*, limfocitele infectate cu EBV sunt imortalizate, se divid și generează liniile limfoblastoide (LLB).

Pentru a nu se dilua în populația limfocitelor B, care se divid, genomul viral trebuie să se replice. În celula infectată latent se sintetizează proteinele de latență, cu rol în replicarea genomului: 6 EBNA (1– 6), 3 proteine de membrană și 2 tipuri de ARN poliadenilate.

O mică *proporție a limfocitelor B infectate latent*, devin permisive pentru multiplicarea virală. Virionii progeni reinfectează celulele epiteliale ale orofaringelui și astfel virusul se propagă în populația umană. Infecția primară este foarte contagioasă, deoarece virusul se multiplică în epiteliul orofaringian și în glandele salivare și se transmite prin salivă (boala sărutului).

Imortalizarea limfocitelor B. In vitro, limfocitele B mici, în repaus, infectate latent cu EBV, se activează, adică intră în diviziune, cu creșterea expresiei HLA-DR, a volumului nucleului și citoplasmei. După 36 ore, este inițiată sinteza ADN și la 72 de ore celulele se divid. In acest timp, se sintetizează predominant IgM, detectabil în citoplasmă și în mediu, ca rezultat al activării policlonale a celulelor B. Activarea duce la *imortalizare permanentă.* După inițierea sintezei ADN, celulele continuă să prolifereze *in vitro*, ca *l*inie *c*elulară B *l*imfoblastoidă pozitivă pentru EBV (LCL). O minoritate (<1–10%) dintre celulele LCL, la un moment dat, intră în ciclul litic productiv.

În laborator, EBV se foloseşte pentru imortalizarea limfocitelor B. Cele mai multe linii de celule B imortalizate, produc cantităţi mici de virus infecţios.

Proteinele latenţei. Virusul codifică circa 70 de proteine de dimensiuni medii. În celulele infectate *latent* se sintetizează 11 tipuri de molecule (*9 proteine* şi *2 tipuri de ARN* cu dimensiuni mici, abundente cantitativ, dar netraduse, cu funcţie necunoscută), altele decât moleculele sintetizate în ciclul litic. Cele 9 proteine sunt localizate *în nucleu* şi în *citoplasmă* şi sunt exprimate în celulele infectate latent, în plus faţă de proteinele imediate, timpurii şi tardive, asociate cu ciclul litic.

EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigen), grupul cel mai important al proteinelor latenţei, s-a detectat prin IF directă în nucleul limfocitelor B imortalizate cu EBV. S-au identificat 6 proteine EBNA: 1, 2, 3A, 3B, 3C şi proteina leader (LP), toate traduse dintr-un ARNm policistronic prin înnădire alternativă.

Alte proteine ale latenţei au localizare membranară: LMP1, esenţială pentru imortalizare şi proliferarea continuă a celulelor B, inductoare a fenotipului tumorigenic; LMP2A şi LMP2B, se sintetizează prin înnădire alternativă de la un ORF.

Proteinele ciclului litic. Genele ciclului litic sunt omologe cu ale altor virusuri herpetice şi urmează o cascadă ordonată, expresia fiecărui set fiind activată de setul anterior şi inhibat de următorul. Genele sunt grupate în timpurii immediate (IE), timpurii (E) şi tardive (L), exprimate înainte şi respectiv după replicarea genomului. Genele IE, în număr de două, au rolul de a transactiva genele E, comutând astfel infecţia latentă în infecţia litică. Genele E codifică circa 30 de proteine, unele difuze (D), cu localizare nucleară şi citoplasmatică şi proteine R (restricted), cu localizare restrânsă la nucleu. Majoritatea au funcţii enzimatice pentru replicarea ADN viral. Genele L codifică antigenele capsidei virale (VCA), proteine neglicozilate, identificate cu dificultate datorită absenţei unui sistem litic *in vitro.*

Glicoproteinele sunt inserate în membrana celulei infectate. Din setul celor 10 identificate, câteva devin componente ale învelişului viral. Glicoproteina majoră a învelişului (gp340) mediază legarea virusului pe membrana limfocitului B, la CR_2. Anticorpii anti-gp320 sunt neutralizanţi. Glicoproteina 85 mediază fuziunea peplosului cu membrana celulei.

Epidemiologie. Gazdele naturale ale EBV sunt omul şi câteva primate. Circa 90% din populaţia adultă este infectată cu EBV, îl păstrează tot restul vieţii în limfocitele B şi elimină virus progen prin salivă. Sursa de infecţie nu este determinată şi de aceea, perioada de incubare se stabileşte cu dificultate, dar pare a fi necesară o perioadă de 30–50 de zile înainte de apariţia simptomelor. Infecţia primară se face prin contactul direct cu un individ producător de virus. Virusul se transmite prin sărut, pe cale sexuală (s-a detectat în spermă), prin sângele transfuzat, prin organele transplantate. EBV este endemic în ţările subdezvoltate: 90% dintre copii fac o infecţie subclinică. In ţările dezvoltate, infecţia clinică are cea mai mare frecvenţă între 15–25 ani. Infecţia timpurie conferă rezistenţă la infecţia ulterioară. De aceea, adolescenţii şi adulţii tineri rareori fac infecţii clinice cu EBV. In studiile seroepidemiologice, prezenţa sau absenţa IgG anti-VCA (antigenul capsidei virale) este definitorie, deoarece IgG apare timpuriu în infecţia primară şi persistă toată viaţa. Seropozitivitatea creşte cu vârsta şi atinge 90% la adulţi. Sunt două perioade cu rata maximă a *seroconversiei*: 1–6 şi 14–20 ani. Cele mai multe seroconversii sunt subclinice, dar infecţia în perioada adolescenţei sau tinereţii poate fi asociată cu mononucleoza infecţioasă. Detectarea EBV (prin imortalizarea limfocitelor B) în probele de salivă, spălături nazofaringiene, arată că excreţia orală a virusului se face continuu sau intermitent, la cei mai mulţi indivizi seropozitivi.

IgM şi IgA anti-Ag capsidei virale şi IgG anti-Ag timpurii ating valoarea maximă în faza acută a MI şi scad în convlescenţă. In MI se sintetizează o diversitate de auto-Ac: aglutinine la rece, FR, anticorpi anti-nucleari, anti-plachetari şi anti-muşchi neted, datorită stimulării policlonale a limfocitelor B. Auto-Ac sunt tranzitorii şi inofensivi.

Patogeneza

VEB produce mononucleoza infecţioasă (MI), o maladie limfoproliferativă autolimitată, benignă. Infecţia limfocitelor B, predominant neproductivă (latentă), cel puţin *in vitro*, poate evolua litic, cu producerea de virus progen. EBV1 imortalizează mai eficient limfocitele B din *criptele tonsilare*, urmată de *latenţă* cu expresia limitată a genelor, activarea celulei şi proliferarea, amplificând

numărul de celule infectate la poarta de intrare. Limfoblastele B trec în sângele periferic şi se diseminează sistemic. Prezenţa lor în circulaţie stimulează răspunsul celulelor T, al căror număr creşte semnificativ (mononucleoză).

Denumirea de *mononucleoză infecţioasă* se datorează existenţei celulelor mononucleate atipice în sângele periferic. Morfologic, celulele atipice sunt limfocite mari activate (10–20 μm), care la coloraţia May Grunwald Giemsa evidenţiază o citoplasmă abundentă, vacuolată, nucleu alungit şi indentat, cromatină granulară. Acestea sunt *celule TCD_8* citotoxice (15 x 10^9/l), *activate specific faţă de Ag EBV şi determină leucocitoza* observată în primele 2 săptămâni de MI. Limfocitele TCD_8 sunt active faţă de antigenele care se sintetizează în ciclul litic al EBV, dar puţin eficiente faţă de Ag sintetizate de celulele infectate latent. Un număr mic de celule mononucleare atipice apar în sânge şi în alte infecţii virale acute: CMV, VHB, influenza B, rubela, dar sunt cele mai evidente în MI.

Celulele TCD_4 şi NK activate cresc numeric în MI, celulele B sunt de obicei în număr normal sau cresc uşor, sunt infectate în proporţie de $1/10^4$–10^5 şi exprimă toate proteinele infecţiei virale latente.

Testele anormale ale funcţiei hepatice care reflectă gradul distrugerii tisulare se găsesc la 80–90% dintre pacienţi. Enzimele hepatice cresc în 2–3 săptămâni de MI şi revin la normal la 5 săptămâni.

MI apare la adolescenţi şi la adulţii tineri, ca rezultat al infecţiei primare şi începe abrupt cu durere în gât şi de cap, adenopatie cervicală. Simptomele sunt nespecifice (senzaţia de frig, febră, transpiraţie, stare de rău general, anorexie, disconfort abdominal vag datorită limfadenopatiei). Ruperea splinei este o complicaţie cunoscută dar rară a MI, după traumatisme de intensitate medie. Ruperea produce durere bruscă şi intensă şi necesită intervenţie chirurgicală imediată.

Virusul infectează celulele epiteliului orofaringian sau celulele B din tonsile, unde epiteliul de suprafaţă este discontinuu şi virusul are acces direct la limfocite. Infecţia iniţială a celulelor B este urmată de expresia genelor de latenţă, activare celulară şi proliferare, amplificând populaţia de celule infectate la poarta de intrare.

Limfocitoza MI este însoţită de depresia celor mai multe funcţii ale limfocitelor T, inclusiv a HSÎ.

Simptomele MI nu sunt cauzate direct de celulele B infectate de EBV, ci de natura imunopatologică, datorată sintezei masive de citokine de către celulele TCD_8 şi mai puţin de către CD_4 şi NK. Aceste celule controlează infecţia şi elimină limfoblastele infectate, dar unele scapă lizei şi realizează infecţia persistentă pentru restul vieţii. Anticorpii anti-glicoproteine virale sunt neutralizanţi.

Eliberarea continuă a EBV, la nivel scăzut, în epiteliul orfaringian se produce la cei mai mulţi indivizi seropozitivi şi poate fi detectată prin testul imortalizării limfocitelor B sau prin evidenţierea ADN viral prin metoda PCR, în salivă sau în spălătura bucofarigiană.

Virusul realizează o infecţie latentă stabilă într-o populaţie de celule B de memorie, cu viaţă lungă. Aceste celule evită acţiunea de supraveghere a RI prin expresia unui număr foarte limitat de gene. Reactivarea periodică a infecţiei latente şi evoluţia litică, permite producerea virusului progen, diseminarea lui şi refacerea populaţiei de celule infectate latent.

Celulele TCD_8 activate specific faţă de Ag EBV se găsesc la toţi indivizii seropozitivi, asimptomatici. Proteina EBNA1 nu este recunoscută de limfocitele TCD_8, pentru că este rezistentă la degradarea în proteasom. Astfel se stabileşte un echilibru al infecţiei, la nivel subclinic. Starea de purtător este caracterizată printr-un echilibru între nivelul infecţiei şi intensitatea RIMH şi RIMC.

Alterarea echilibrului prin infecţii intercurente sau prin medicamente imunosupresoare, determină apariţia manifestărilor clinice ale infecţiei EBV.

MI este stopată prin acţiunea mecanismelor imunitare: celulele T elimină majoritatea celulelor B infectate cu VEB, iar anticorpii neutralizanţi limitează diseminarea infecţiei la alte celule.

Diagnosticul poate fi suspectat pe baze clinice şi pe examenul morfologic al sângelui (limfocite atipice, dar diagnosticul de certitudine este *serologic*: prezenţa Ac faţă de antigenele capsidei EBV (VCA = antigenele capsidei virale).

IgM şi IgA anti-Ag capsidei virale şi IgG anti-Ag timpurii ating valoarea maximă în faza acută a MI şi scad în convlescenţă. In MI se sintetizează o diversitate de auto-Ac: aglutinine la rece, FR, Ac anti-nucleari, anti-plachetari şi anti-muşchi neted, datorită stimulării policlonale a limfocitelor B. Auto-anticorpii sunt tranzitorii şi inofensivi.

Testele anormale ale funcției hepatice, care denotă distrugere tisulară (celulară) se regăsesc la 80–90% dintre pacienți. Enzimele hepatice cresc în săptămânile 2–3 de manifestări clinice și revin la normal în săptămâna a 5-a.

Analiza *histologică* a MI se face pe tonsile, pe splina ruptă. Aceste țesuturi sunt infiltrate cu mononucleare (TCD_8), cu aspect morfologic de imunoblaste.

Metoda clasică pentru evidențierea virusului infecțios în probele pacienților este *testul imortalizării limfocitelor*, în care limfocitele EBV negative sunt expuse la contactul cu proba și apoi sunt cultivate. Prezența virusului în probă este indicată de creșterea celulelor B imortalizate. Expresia CD_{23} este esențială pentru imortalizare. Celulele se divid după 72 de ore și eliberează IgM. *In vitro*, EBV are rolul unui activator policlonal al celulelor B. Dacă proporția celulelor B infectate este mare, *in vitro* apar linii celulare limfoblastoide (LCL) imortalizate spontan. Metoda imortalizării nu se folosește în mod curent pentru că este laborioasă. Liniile imortalizate de limfocite B produc cantități mici de virus infecțios.

Inițial, celulele mici în repaus suferă blastogeneză, cu creșterea volumului celular și a densității HLA-DR.

Un test mai rapid constă în numărarea, într-o linie de celule EBV negative, a celulelor care se infectează după 72 ore de contact cu proba. Evaluarea numerică se face după colorarea pentru *Ag EBNA*.

Detectarea ADN prin *PCR* a înlocuit aceste teste, fiind o metodă mai rapidă și mai sensibilă.

EBV se distinge de alte herpesvirusuri, prin capacitatea de a transforma celulele B *in vitro*, iar *in vivo* este asociat cu o varietate de tumori limfoide și epiteliale: *limfomul Burkitt, maladia Hodgkin, carcinomul nazofaringian*.

Limfomul Burkitt și *carcinomul nazofaringian* apar la indivizii seropozitivi, ca rezultat al modifcărilor genetice în celulele infectate. Limfomul Burkitt este o neoplazie foarte malignă a limfocitelor B, strâns asociată cu infecția VEB. Apare la copiii de 3–15 ani, cu incidență maximă la 6–7 ani. Este mai frecventă la băieți și apare în aria maxilarului. Netratată, evoluează letal în câteva luni de la apariția simptomelor clinice. Neoplazia este foarte sensibilă la *ciclofosfamidă*, dar recurențele apar și sunt tot mai puțin sensibile la terapie. Este endemică în Africa ecuatorială și Papua Noua Guinee și sporadică în toată lumea. In zonele endemice, limfomul reprezintă circa 90% dintre malignitățile copilăriei, în contrast cu 3% în țările occidentale. Forma endemică este limitată în zonele hiperendemice cu malaria *P. falciparum*. Infecția malarică acționează ca stimulator cronic al celulelor B în centrele germinative, dar și ca imunosupresor general, producând a diminuare a IMC specifice față de Ag EBV și creșterea numărului de celule B infectate în sânge. Crește rata de turnover a celulelor B, dar scade rata eliminării celulelor B EBV pozitive. In celulele tumorale s-a evidențiat genomul și Ag EBV. Efectul transformant se explică prin aceea că genomul EBV produce translocație, rezultatul fiind activarea oncogenei *c-myc*.

Carcinomul nazofaringian (NPC) este o tumoră malignă a epiteliului squamos al nazofaringelui.

EBV are, probabil, capacitatea să transforme limfocitele B și poate să determine *limfomul Hodgkin* (HL). In 40% dintre tumorile HL, pe suprafața celulelor Reed-Sternberg se găsesc Ag virale: LMP_1 (latent membrane protein) și $EBNA_2$, sugerând că proteinele virale ar avea rol în dezvoltarea limfomului. HL este de 2–5 ori mai frecvent la pacienții care au avut mononucleoză infecțioasă. Dar 60% dintre cazurile de HL nu au antigene EBV. Se poate admite că EBV nu are totdeauna rol în transformarea malignă a limfocitelor limfomului Hodgkin, iar prezența proteinelor se datorează coincidenței cu prezența virusului în organism.

Bibliografie

Crawford D. H. 2004. *Epstein Barr* Virus, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Birmans B., Reibstein I., Steiner I. 1993. Characterization of an *in vivo* reactivation model of *herpes simplex* virus from mice trigeminal ganglia 1993. J. of Gen. Virol. 74, 2487–2491.

Blacklaws B. A., Nash A. A. 1998. *Herpes simplex* virus, Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, second edition, ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Roizman B. 1996. *Herpesviridae*, în vol. Fields Virology, third edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Avitabil E., Di Gaeta S., Torrisi M. R., Ward P. L., Roizman B., Campadelli-Fiume G. 1995. Redistribution of Microtubules and Golgi Apparatus in *Herpes Simplex Virus*-Infected Cells and Their Role in Viral Exocytosis. Journal of Virology, vol. 69, no. 12, pp. 7472–7482.
Minison A. C. 1998. *Alphaherpesviruses: Herpes Simplex* and *Varicella-Zoster*, în vol. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, ed. by Leslie Collier, A. Balows, M. Sussman.
Roizman B., Sears A. E. 1990. Herpes Simplex Viruses and Their Replication, în vol. Virology, second edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Pellett P. E., Black J. B. 1996. Human *Herpesvirus 6*, în vol. Fields Virology, Third Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Gelb L. D. 1990. *Varicella-Zoster* Virus, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York,.
Cohen J. I., Straus S. E. 1996. *Varicella-Zoster Virus and Its Replication*, în vol. Fields Virology, third edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Braun D. K., Dominguez G. , Pellett P. E. –1997. *Human herpesvirus 6* – Clin. Microbiol. Rev. 10, 521–567.
De Clercq E. 1997. In search of a selective antiviral chemotherapy. Clin. Microbiol. Rev. 10, 674–693.
Kimberlin D. W. 2004. Neonatal *Herpes Simplex* Infection. Clin. Microbiol. Rev. 17, 1–13.
Norkin L. 1995. Virus Receptors : Implications for Pathogenesis and Design of Antiviral Agents. Clin. Micr. Reviews 8, 2, pp. 293–315.
Cleator G. M., Klapper P. E. 2004. *Herpes simplex 1*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Mihăescu Gr. 1985. Inhibition of some deoxyriboviruses replication cycle in tannic acid pretreated cells. Rev. Roum. Biol. 30, 2, 175–179.
Mihăescu Gr. 1985. Macrosegregation of nucleolar components of HEp-2 line cells after tannic acid treatment. Rev. Roum. Biol. 30, 1, 152–156.
Forsgren M., Klapper P.E. 2009. *Herpes simplex* virus Type 1 and Type 2, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, sixth edition, Editors Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, Barry D. Schoub, Paul D. Griffith, Philip Mortimore, John Wiley & Sons, Ltd.
Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.
Kalejta R. F. 2008. Tegument Proteins of Human *Cytomegalovirus*. MMBR, 72, 2, p. 249–265.
Grifith P. D. *Cytomegalovirus*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, 2004, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Griffiths P. D. 1998. *Cytomegalovirus*, Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.
Staczek J. 1990. Animal *Cytomegaloviruses* – Microbiol. Rev., 54(3): 247–265.
Stinski M. F. 1990. *Cytomegalovirus and Its Replication*, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York,.
Britt W. J. 1998. *Betaherpesviruses: Cytomegalovirus, Human Herpesviruses 6* and *7*, în vol. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, edited by Leslie Collier, 1998.
Gompels U.A. 2004. *Roseoloviruses – HH6* and *HH7*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Arvin A. M. 1996. *Varicella-zoster virus*. Clin. Microbiol. Rev. vol. 9, p. 361–381.
Breuer J. 2004. *Varicella zoster virus*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Forsgren M., Klapper P.E. 2009. *Herpes simplex* virus type 1 and type 2, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, sixth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, Barry D. Schoub, Paul D. Griffith, Philip Mortimer, John Wiley & Sons, Ltd.

21.15. Familia Parvoviridae

Parvovirusurile sunt printre cele mai mici şi cele mai simple ca structură, dintre virusurile cu genom ADN. Virionii nuzi au 20–26 nm, simetrie icozaedrică, sunt foarte rezistenți la inactivare şi la 56^0 timp de o oră, stabili la pH între 3–9, dar inactivați de ß-propiolactonă, formaldehidă şi agenți oxidanți. Virionii sunt alcătuiți exclusiv din ADN şi proteine.

Capsida este alcătuită din 2 proteine (VP1 şi VP2) codificate de o secvență comună prin schimbarea cadrului de citire. VP2, proteina majoră a capsidei, este identică cu regiunea C-terminală a VP1.

Familia este împărțită în două subfamilii:

- *Parvovirinae*, infecțioase pentru numeroase animale cu sânge cald: păsări domestice, diferite mamifere, inclusiv omul;
- *Densovirinae*, infecțioase pentru insecte.

Fiecare subfamilie are 3 genuri. Subfamilia *Parvovirinae* cuprinde următoarele 3 genuri, cu asemănări genomice semnificative:

- *Parvovirus* se multiplică *autonom* în celulele mamaliene care cresc şi se divid, ale speciilor sensibile. Multiplicarea unor parvovirusuri în celulele umane este mult stimulată prin co-infecţia cu adenovirusuri; parvovirusul canin (CPV), virusul panleucopeniei felinelor;
- *Dependovirus (AAV= adeno associated viruses)*, exceptând condiţiile speciale, pentru multiplicare, necesită *co-infecţia* cu un adeno- sau cu un herpes. Nu produc manifestări clinice;
- *Erythrovirus* (parvovirusul B_{19}), cu tropism pentru celulele precursoare ale eritrocitelor, produce eritem infecţios, un exantem comun al copilăriei.

Virionul are o structură simplă. Capsida, cu simetrie icozaedrică, este alcătuită din 60 de capsomere şi conţine trei proteine (P_1, P_2, P_3) cu secvenţe de aminoacizi parţial suprapuse.

Genomul mc, linear, este printre cele mai mici (alături de hepadna, papova) şi are circa 5000 baze. Datorită dimensiunilor mici ale genomului, proteinele sunt codificate de cadre de citire care se *suprapun parţial*. Genele codificatoare sunt localizate între buclele terminale, în două casete genice: cea stângă codifică 2–4 proteine *reglatoare* (nestructurale) ce controlează replicarea ADN, iar cea dreaptă codifică 2–3 proteine *structurale* (capsidale) cu secvenţe parţial suprapuse de aminoacizi, traduse din ARNm înnădite alternativ.

Cele mai multe parvovirusuri autonome conţin o catenă de ADN de *polaritate negativă*, complementară ARNm. La unele virusuri (AAV, *Densovirus, B_{19}*), virionii conţin catena de complementaritate pozitivă sau negativă, în proporţii egale.

Genomul are secvenţe palindromice la capetele 5' şi 3' ale catenei antimesager. La capătul 3', palindromul are circa 115 baze, la AAV, palindromul terminal are 125 de baze, iar la parvovirusul B_{19}, peste 300 nucleotide lungime. Datorită naturii palindromice, capătul 3' se pliază înapoi faţă de propria-i secvenţă şi formează o structură în *buclă de ac de păr* (hairpin), prin formarea legăturilor de H între secvenţele complementare.

Capătul 5' (capătul drept) palindromic şi formează o nouă buclă în ac de păr, dar secvenţa este complet diferită de a capătului 3'. Excepţia este virusul B_{19}, la care secvenţele celor două capete sunt identice.

Palindroamele nu sunt totdeauna perfecte. Secvenţa 5' nu este totdeauna unică, ci poate fi repetată în ordine inversată (flip-flop).

Strategii de codificare. Dimensiunile mici ale genomului au condus la evoluţia unor variate strategii pentru codificarea proteinelor necesare unei infecţii productive: doi *promotori* (unul la capătul stâng, iar al II-lea este tot în jumătatea stângă), *înnădirea alternativă* a mesagerilor, utilizarea unui *codon neobişnuit* de *iniţiere a traducerii*, *clivajul* proteolitic.

Multiplicarea. Parvovirusurile autonome par a fi foarte specifice pentru gazdă şi au un tropism tisular foarte specific. Receptorii celulari pentru parvovirusuri par să conţină *acid sialic*, deoarece pretratarea celulelor cu NA inhibă ataşarea virusului.

Parvovirusurile se multiplică în *nucleul celulei* şi au un grad înalt de dependenţă de funcţiile celulei. Genomul de dimensiuni mici codifică un număr mic de proteine, iar multiplicarea depinde de proteinele celulei gazdă. Unele proteine (ADN-pol) ale celulei cu rol în replicarea ADN viral sunt disponibile numai în faza S a ciclului celular, când are loc sinteza ADN propriu, ceea ce limitează multiplicarea virusului la faza S, în contrast cu multiplicarea virusurilor herpetice care codifică sinteza propriilor enzime de replicare a ADN şi virusul se multiplică în orice fază a ciclului celular.

Replicarea genomului. Molecula ADN monocatenar este o structură neobişnuită pentru replicare şi are 2 particularităţi:

- existenţa secvenţelor palindromice terminale scurte, care se pliază înapoi şi creează un duplex telomeric în formă de buclă în ac de păr. La genomul heterotelomeric buclele terminale sunt diferite ca secvenţă una de cealaltă. La cel homotelomeric, ele formează o parte a secvenţei terminale repetate ce poate fi directă sau repetată. Buclele terminale sunt esenţiale pentru strategia unică a replicării ADN: modelul buclei rotative, un marker invariant al familiei;

– replicarea genomului are loc în nucleul celulei, este catalizată de ADN-pol celulară prin mecanismul de auto-primare şi generează o moleculă lineară dublu-catenară. Sinteza noilor catene progresează printr-un mecanism unic, al dislocării (înlocuirii) unei catene, astfel că nu există sinteza unei catene *lagging*. Virionii progeni au o catenă de ADN de polaritate pozitivă sau negativă.

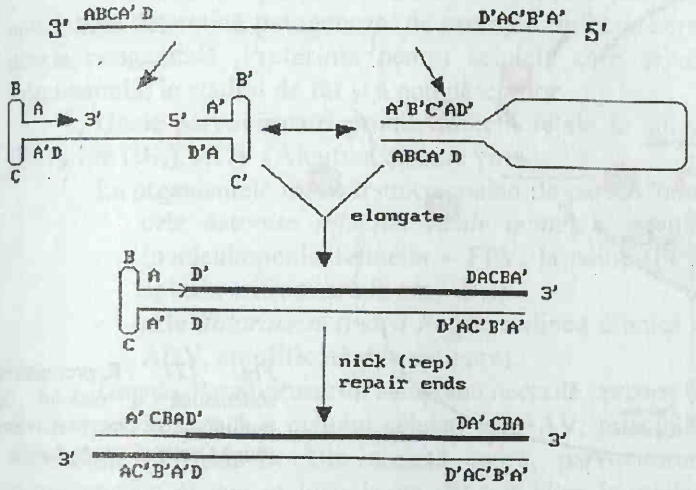


Fig. 423. Modelul replicării ADN monocatenar al parvovirusurilor. La capetele catenei se găsesc secvenţe palindromice repetate invers care formează bucle în ac de păr. Secvenţa de la capătul 3' are rol de primer pentru sinteza catenei complementare. Rezultă astfel intermediarul dublu catenar de replicare (după Berns, 1990).

Toate ADN-polimerazele necesită un primer şi o matriţă. Capetele moleculei genomice lineare conţin secvenţe palindromice, identice sau diferite, cu rol de primer. Gruparea 3'OH de la capătul are rol de primer, la care se leagă enzimele de replicare, iar catena creşte în direcţia 5' --- 3'.

* Nu se ştie dacă lanţul parental se pliază simplu faţă de capătul 3', pentru a servi ca primer pentru iniţierea replicării, sau dacă SRI terminale trebuie mai întâi să-şi împerecheze bazele. Varianta ultimă este mai probabilă, pentru că un astfel de *duplex terminal* este echivalentul structural al intermediarului dublu catenar de replicare, de la care se iniţiază ciclurile de replicare.

ADN mc este convertit la ADN dc sub acţiunea ADN-pol celulare. După conversia la forma dc, ADN este replicat printr-un mecanism al buclei în ac de păr.

Transcrierea. ARN-pol II a celulei transcrie genele virale, iar factorii celulari ai transcrierii sunt esenţiali. Copiile primare sunt prelucrate prin înnădire şi rezultă ARNm de două clase dimensionale:

– cele mari codifică proteine NS, care se fosforilează şi controlează expresia genelor şi replicarea ADN;
– cele mici codifică proteinele structurale.

Proteinele structurale se asamblează în precapsidă, în care este încorporat ADN viral de polaritate pozitivă sau negativă. Una dintre proteinele NS funcţionează ca helicază şi despiralizează ADN dc, astfel ca o singură catenă să fie împachetată.

Infecţia cronică. Parvovirusurile autonome produc frecvent, *in vivo,* infecţii cronice latente în substratul semipermisiv (un nivel scăzut al multiplicării), dar nu s-a evidenţiat integrarea ADN viral în ADN celular. Echivalentul *in vitro* este evoluţia independentă de tip *echilibrat*, cu stabilirea stării de *purtător*: proporţia celulelor permisive este mică. Apar însă frecvent variante virale ce pot infecta majoritatea celulelor. S-a observat şi evoluţia inversă, în cursul căreia celulele rezistente apar din clone de celule sensibile.

Multiplicarea parvovirusurilor (fig. 424) necesită trecerea celulelor prin faza S. De aceea, *in vivo*, cele mai ample leziuni se produc după infecţia *in utero* şi a animalelor nou născute. Infecţia organismelor adulte este mai puţin virulentă, deşi în ţesuturi se găsesc celule care se divid. Sensibilitatea la infecţia cu parvovirusuri este dependentă nu numai de faza S a celulei, ci şi de *starea ei de diferenţiere*. Se crede că *dediferenţierea* prin transformare poate conferi sensibilitate la infecţia cu parvovirusuri, dar transformarea *per se* nu este suficientă.

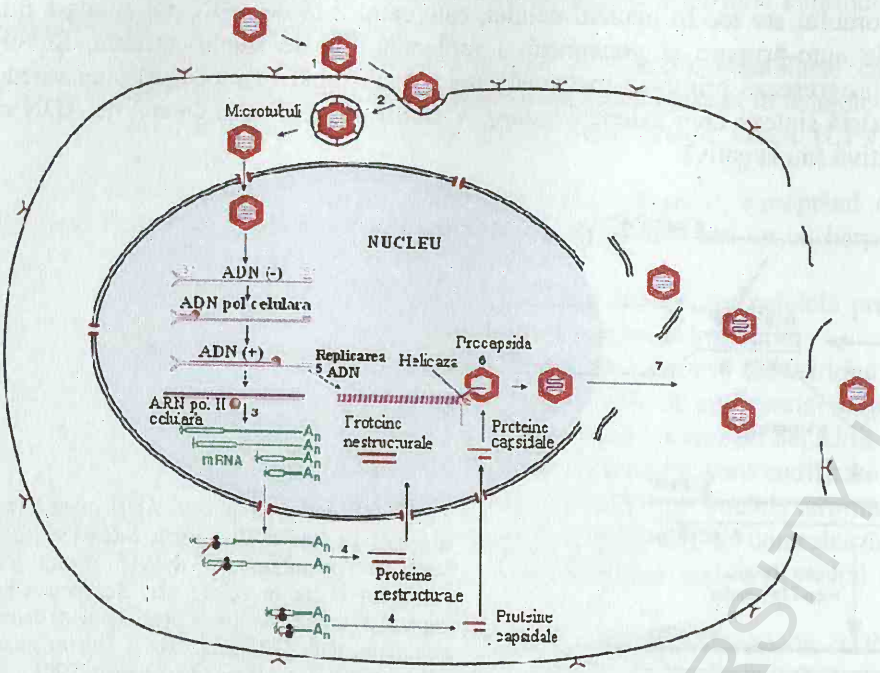


Fig. 424. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a unui parvovirus (după Carter şi colab, 2007).

Multiplicarea *Dependovirus* (AAV) necesită co-infecţia cu virusuri neînrudite, pentru funcţia helper: adeno-, herpes, *inductoare ale fazei S*. În absenţa virusului helper, AAV pot produce o infecţie latentă *in vitro*, ce implică *integrarea ADN într-un situs unic al cromosomului 19*.

Cel mai eficient factor pentru ca celulele să devină permisive la multiplicarea AAV, este infecţia cu un adenovirus helper sau cu un herpesvirus (HSV-1, HSV-2, CMV). Genele timpurii ale adenovirusurilor au rol de helper (E1a, E1b, E2a, E4).

Suprainfecţia substratului celular purtător de provirus parvoviral, cu adeno- sau herpes, induce *excizia genomului integrat* şi iniţierea infecţiei productive. Genele adenovirusului influenţează expresia genelor parvovirale: favorizează transcrierea ARNm şi transportul lor în citoplasmă, stimulează traducerea ARNm. De aceea, s-a presupus că AAV este integrat în cromosomul 19, ca o strategie a latenţei, în absenţa virusului helper. Infecţiile latente cu *Dependovirus* s-au găsit la numeroase linii celulare umane şi de primate.

Dependenţa multiplicării AAV de virusul helper nu este absolută. Trăsătura particulară a biologiei lor este lipsa permisivităţii celulelor *in vitro*, dacă nu sunt expuse la ceea ce se consideră a fi *"condiţii toxice"*. Expunerea câtorva tipuri de linii celulare la factorul termic, radiaţii UV, cicloheximidă (blochează ciclul celular la *graniţa G_1-S*), hidroxiuree şi carcinogeni chimici, face celulele permisive pentru multiplicarea virală sau permite acumularea ARNm virali şi replicarea ADN viral, în absenţa co-infecţei cu un virus helper. *Concluzia este că la AAV, la virusurile helper (adeno-, herpetice) şi în celulele umane se găsesc gene care au un mecanism reglator comun.* Aceste rezultate pun la îndoială existenţa unei dependenţe speciale între adenovirusuri şi AAV. Mai probabil, multiplicarea AAV este dependentă de mediul celular, care poate fi permisiv sau nepermisiv. Co-infecţia cu un virus helper (adeno-, herpes) modifică mediul intracelular şi celula produce ambele tipuri de virioni.

Radiaţia UV produce leziuni ale moleculei de ADN, care activează *mecanismele de reparare*. Probabil activarea căilor de reparare induce efecte celulare favorabile multiplicării AAV.

Prin definiţie, virusurile sunt entităţi cu un parazitism de tip special, absolut, de nivel genetic. Pentru toate virusurile, există substraturi celulare permisive şi nepermisive. Se crede că AAV au elaborat o strategie care le permite să stabilească un raport stabil cu celula, *atâta timp cât fiziologia celulei este nealterată*. Dacă celula este lezată, este activată multiplicarea productivă a AAV şi virusul ajunge la o nouă gazdă. Acest mod de multiplicare implică o formă superioară de parazitism.

In vivo, ciclul viral este mai puţin cunoscut. AAV este contaminant al izolatelor de adenovirusuri. Se presupune că infecţia naturală cu AAV se face pe cale respiratorie sau gastro-intestinală, ca şi cu adenovirusuri. Nu se ştie care sunt ţesuturile sau organele infectate latent în organismul uman: ar putea fi celulele liniei hematopetice, tractul genital feminin.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

AAV s-au găsit cu o frecvență mare (20%) în biopsiile din mușchii striați. Cromosomul 19 codifică pentru troponină, dar mușchiul scheletic nu este infectat cu adeno- sau cu herpes după inoculare intravasculară. Astfel, mușchiul striat poate fi un rezervor de virus protejat de activarea cu virusul helper. Pentru că fibrele musculare sunt multinucleate, integrarea AAV și posibila inactivare a genei troponinei produce efecte minime. Dar nu s-a evidențiat integrarea genomului viral în cromosomul 19 din probele infectate de la om.

Infecțiile cu parvovirusuri sunt adeseori persistente și uneori, asimptomatice. Tropismul specializat determină patogeneza: de exemplu, infecția cerebelului în timpul dezvoltării fetale duce la ataxia congenitală. Preferința pentru celulele care se divid rapid explică sensibilitatea înaltă a organismului în stadiul de făt și a nou născuților.

Unele parvovirusuri produc infecții fetale la animale: porcine (PPV), bovine (BPV), gâscă (H-1), om (B_{19}), ADV (Aleutian disease virus).

La organismele mai vârstnice, maladiile parvovirale sunt de 2 categorii:

- cele datorate *infecției virale acute*, ca rezultat al multiplicării în țesuturile sensibile (panleukopenia felinelor – FPV, la suine (PPV) și bovine, hepatita la hamster și gâscă, aplazia eritrocitară la om – B_{19})
- cele *datorate activării RI* (dezordinea cronică cu CI produsă de Aleutian disease virus – ADV, amplificată de vaccinare).

Latența. Parvovirusurile autonome necesită aproape în mod absolut, o populație de celule care se divid rapid, în faza S a ciclului celular. La AAV, principiul este același, dar virusul helper suplinește dependența de faza S. Din această cauză, parvovirusurile produc infecții persistente și uneori asimptomatice, *in vivo*, inclusiv la om, dar și *in vitro*, în celula intactă. Culturile celulare primare eliberează frecvent virusuri după stimularea adecvată sau odată cu degenerarea culturii. 20% dintre culturile celulare de AGMK și 1–2% dintre culturile embrionare umane de rinichi sunt infectate latent, natural.

Infecția cu AAV, în absența co-infecției cu un virus helper (adeno, herpes-1, herpes-2, CMV, papiloma, virus vaccinal), este *latentă:* genomul AAV este exprimat într-o măsură limitată și se replică. Latența este însoțită de *integrarea* ADN viral, în cromosomii perechii 19. Integrarea se face sub forma copiilor dublu-catenare repetate în tandem. Se presupune că infecția latentă *in vivo* este comună la om, dar nu este asociată cu manifestări cunoscute.

În celula suprainfectată cu un virus helper, genomul AAV este excizat din inserțiile sale și se asamblează virus progen infecțios.

Infecția latentă poate fi indusă *in vitro*, prin inocularea cu AAV la multiplicitate înaltă (10–1000 UI/celulă) a liniilor continui de celule umane, în absența virusului helper. Infecția a rămas latentă peste 50 de pasaje. ADN viral este, de cele mai multe ori, *integrat în ADN celular*, sub forma câtorva copii repetate în *tandem* (cap-coadă), capetele genomului viral fiind, de cele mai multe ori, în joncțiune strânsă cu secvența ADN celular. Joncțiunea cu secvențele celulare este mediată de secvențele terminale. Integrarea are specificitate de situs în cromosomul 19 și se face prin recombinare neomologă, deși există 4–5 baze omologe. Deși are specificitate de situs, integrarea nu se face strict la nivelul unei nucleotide, ci are loc într-o secvență de câteva sute de nucleotide.

Secvențele integrate se pot *exciza* spontan. Nu se știe dacă excizia este o etapă inerentă a replicării sau dacă excizia precede replicarea.

Supresia oncogenezei. Parvovirusurile sunt unice printre virusurile nucleare ADN prin faptul că nu au fost niciodată implicate în oncogeneză. Multe parvovirusuri s-au izolat din celulele maligne. Aceste virusuri nu induc malignizarea, dar celulele tumorale au devenit permisive pentru multiplicare, rezultatul fiind liza.

Adenovirusurile produc sarcoame hemoragice la situsul injectării la puii nou-născuți de hamster sirian. Adăugarea AAV la inocul, prelungește perioada de inducere și scade frecvența neoploziilor. *In vitro*, AAV inhibă transformarea cu adenovirusuri.

Proteinele NS acționează ca reglatori *trans* (sunt active asupra altor gene decât cele care le-au codificat), pozitivi sau negativi ai expresiei genice.

Virusul B_{19} are tropism pentru celulele eritroide. Receptorul este antigenul P de grup sanguin (un globozid), prezent pe precursorii eritrocitelor, pe megacariocite, pe celulele endoteliale, pe placentă, pe celulele fetale cardiace, pe eritrocitele mature, ceea ce explică tropismul tisular limitat.

Virusul infectează, în primul rând, precursorii eritrocitelor în măduva osoasă, dar şi alte celule (ficatul fetal). Efectul multiplicării virusului este întreruperea producerii eritrocitelor, iar la pacienţii imunocompromişi se instalează anemia. Infecţia cronică poate să producă moartea fătului.

Virusul se găseşte în sânge şi în secreţiile tractului respirator. Probabil, virusul se transmite pe cale respiratorie, parenteral prin transfuzia sanguină şi a derivatelor sale, dar şi pe verticală, de la mamă la făt, prin placentă. În faza viremiei, virusul se transmite prin sânge.

La adult, infecţia cu virusul B_{19} implică articulaţiile mâinilor şi genunchilor, tabloul patologic fiind asemănător artritei reumatoide. Artropatia durează perioade variabile: săptămâni sau chiar ani.

Perioada de incubaţie este de 1–3 săptămâni. Viremia apare la o săptămână după infecţie şi durează o săptămână, timp în care virusul se găseşte în secreţia nazofaringiană, ceea ce denotă că se eliberează prin faringe.

Virusul B_{19} este larg răspândit, iar procesul infecţios evoluează tot timpul anului, la toate grupele de vârstă, sub forma epidemiilor explozive sau a cazurilor sporadice. Infecţia este mai frecventă la copii. Antigenele virale induc sinteza IgM şi IgG. Circa 60% dintre adulţi sunt seropozitivi.

Virusul infectează indivizii imunosupresaţi, incapabili să sintetizeze Ac neutralizanţi. Anticorpii au rol esenţial pentru eradicarea infecţiei. Administrarea preparatelor imunoglobulinice comerciale poate să vindece sau să amelioreze infecţiile persistente cu parvovirusul B_{19}. Globozida cu rol de receptor de virus se găseşte pe epiteliul placentei: infecţia la făt evoluează rapid, cu creşterea ratei de turnover a eritrocitelor, pe fondul imaturităţii sistemului imunitar. Virusul B_{19} se dezvoltă în miocard şi miocardita este asociată cu insuficienţa cardiacă.

Patogenia virusului B_{19} are două componente: infecţia litică a celulelor sensibile şi interferenţa cu răspunsul imun. La voluntari, viremia atinge nivelul maxim în zilele 8–9 (10^{11} virioni/ml) şi este asociată cu limfopenie, neutropenie, trombocitopenie, cu scăderea numărului de reticulocite şi a cantităţii de hemoglobină.

Nu există vaccin faţă de infecţia cu virusul B_{19}, dar sunt vaccinuri faţă de infecţiile parvovirale la pisică, câine, porc.

Harta genetică. Un ORF în partea dreaptă a genomului, codifică cele 3 proteine ale capsidei virale. Schimbarea cadrului de citire şi mutantele de deleţie în această regiune nu blochează replicarea ADN.

În jumătatea stângă a genomului există un alt ORF. Se numeşte regiunea *rep*, deoarece orice mutaţie frameshift sau prin deleţie, blochează *replicarea ADN.*

Este posibilă deleţia selectivă a regiunii *rep* şi obţinerea unor variante moleculare genomice în care replicarea ADN este blocată. Expresia proteinei *Rep* este însă esenţială pentru integrarea la situs specific în cromosomul 19.

Vectorii recombinanţi AAV ce poartă o genă selectată, flancată de secvenţele terminale (TR), dar deletaţi pentru gena *rep*, nu se integrează în cromosomul 19, ci se integrează la alte situsuri, nespecifice.

Vectorul AAV se foloseşte pentru *terapia genică.* Vectorii recombinanţi AAV pot să transducă gene într-o varietate de ţesuturi ale căror celule nu se divid: celulele globului ocular, SNC, muşchi, ficat, plămân. Genomul vector AAV persistă perioade lungi: 2 ani în muşchi, SNC, ochiul rozătoarelor, fără diminuarea expresiei genice.

Utilizarea AAV ca vector genic este avantajoasă: injecţia AAV ca vector nu stimulează răspunsul inflamator, răspunsul limfocitelor T este de mică intensitate, comparativ cu alţi vectori, deoarece AAV nu infectează eficient CPA.

Bibliografie

Berns K. I. 1990. *Parvoviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Berns K. I. 1996. *Parvoviridae:* The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Heegard E. D., Brown K.E. 2002. Human *Parvovirus B19* – Clin. Microbiol. Rev. 15, 485–505.

Berns K. I. 1990. *Parvovirus* Replication. Microbiol. Rev. 54 (3): 316–329.
Zuckerman A. J., Banatvala J. E., Pattison J. R., Griffith P. D., Schoub B. D. 2004. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, John Wiley & Sons, Ltd.
Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.

21.16. Familia Poxviridae

Denumirea "pox" provine de la cuvântul englezesc "pock" (pustulă, ulcerație). Familia *Poxviridae* include cele mai mari și mai complexe virusuri, patogene pentru om și animale, la care produc infecții generalizate, cu erupții veziculare sau pustulare cutanate (variola, vaccina) sau tumori benigne la om (*Molluscum contagiosum*) și la iepure (fibromul Shope).

Poxvirusurile sunt clasificate în 2 subfamilii:

- *Chordopoxvirinae*, infecțioase pentru vertebrate;
- *Entomopoxvirinae*, infecțioase pentru nevertebrate: *Melolontha* (coleopter), *Amsacta moori* (lepidopter), *Chironomus* (dipter).

În funcție de gazdă se disting 8 genuri de poxvirusuri infecțioase pentru vertebrate: *Orthopox* (variola, vaccina etc.), *Parapox (Orf)*, *Capripox* (infecțioase pentru ovine, caprine), *Leporipox* (virusul mixoma, transmis de țânțar, produce leziuni tegumentare la anumite genuri de *Leporidae*; virusul fibromului Shope, transmis de un artropod, produce papilomul Shope la iepurele de viziună *Sylvilagus* în America de Nord), *Suipox* (infecțios pentru porc), *Avipox* (infecțios pentru păsari), *Molluscipox* (produce tumori benigne la om) și *Yatapox* (produce tumori benigne la primate). Ultimele două nu se cultivă.

Structura. Cel mai studiat este virusul vaccinei, cu formă paralelipipedică (cărămidă cu colțurile rotunjite) și dimensiuni de 220 x 220 x 280 nm. Altele au formă elipsoidală, cu dimensiuni de 400 x 230 nm, la limita de rezoluție a microscopului optic.

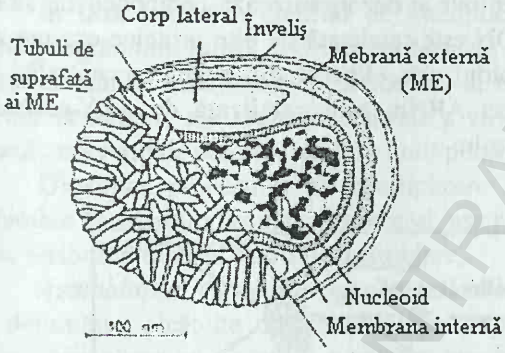


Fig. 425a. Reprezentarea schematică a structurii virionului pox (după Buller, 1991).

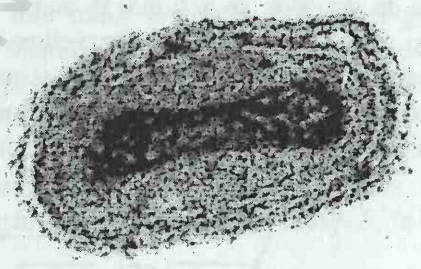


Fig. 425b. Imagine electrono-optică a secțiunii virionului vaccinal. În regiunea centrală se distinge nucleoidul electronodens. Regiunea centrală este acoperită de membrana externă și de învelișul extern, ambele pluristratificate, x 160.000, original.

Virionul este format dintr-un *nucleoid*, bine delimitat pe imaginile electrono-optice ale virusului în secțiune frontală, în care se găsește ADN viral, având de fiecare parte câte o masă laterală, denumită *corp lateral*. În virion, nucleoidul are formă de disc biconcav, cu aspect de halteră și este acoperit de *membrana internă* omogenă și de un *strat extern* alcătuit din subunități cilindrice scurte, cu aspect striat (fig. 425a).

Zonele concave ale nucleoidului sunt ocupate de corpii laterali, de natură proteică. La exterior se găsește *membrana externă*, de natură lipoproteică, care conține toate fosfolipidele virionului, colesterol și grăsimi neutre. Membrana externă este tapetată cu structuri de formă tubulară, vizibile la microscopul electronic pe preparatele colorate negativ (fig. 425 b). La unele tulpini de virus, în diferite substraturi celulare, virionul dobândește un *înveliș lipidic extern* suplimentar.

Compoziția chimică. Componentele principale ale virionului sunt proteinele (90%), lipidele (5%) și acizii nucleici (3,2%). Proteinele se solubilizează la 100° în prezența SDS și a unui agent reducător. La electroforeza bidimensională se disting circa 100 de proteine, dar potențialul de codificare a genomului este mult mai mare. Numai în înveliș se găsesc 10 polipeptide, dintre care 9 sunt glicozilate.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reprezentanții familiei *Poxviridae* codifică un set de enzime mult mai diversificat în comparație cu alte virusuri, unele esențiale pentru desfășurarea ciclului de multiplicare, iar altele neesențiale. Dintre cele esențiale fac parte *ARN-polimeraza* dependentă de ADN, enzimele de prelucrare post-transcriere a ARN (de bonetare și adenilare), *ADN-polimeraza* și *topoizomeraze ADN* (enzime care modifică conformația spațială a ADN, prin ruperea catenelor, producând relaxarea ADN suprahelical, în absența unui cofactor energetic). Discontinuitățile create prin clivarea unei catene sunt reunite prin acțiunea *ligazei*, din echipamentul enzimatic al virionului.

Genomul poxvirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, care conține 130–300 kbp (85000 kDa la parapoxvirusuri și 185000 kDa la avipoxvirusuri), distribuite în circa 200 de gene. Capetele celor două catene au o conformație în buclă de ac de păr, cu secvențe terminale repetate invers, identice, dar orientate pe catene opuse. Secvențele terminale ale celor două catene sunt *legate covalent* și formează un lanț nucleotidic continuu. Repetițiile terminale inversate includ secvențe codificatoare, ceea ce face ca unele gene să se găsească la ambele capete ale genomului. Prin denaturare, molecula devine lineară monocatenară. Funcțional, genomul este organizat în circa 180 ORF. Majoritatea genelor esențiale sunt localizate în partea centrală a genomului, iar genele neesențiale (favorizează multiplicarea *in vitro*) sunt localizate la capete.

Poxvirusurile, iridovirusurile insectelor și virusul febrei suine africane au o particularitate unică printre dezoxiribovirusuri: ciclul de multiplicare se desfășoară *în citoplasmă*, fiind total independent de nucleul celulei, deoarece codifică aproape toate funcțiile necesare replicării genomului. Experimental, s-a demonstrat că replicarea genomului acestor virusuri are loc și în celulele *enucleate* cu citocalazina B.

Ciclul de multiplicare (fig. 426). Virionul este înglobat în celulă, prin pinocitoză mediată de receptori, a căror structură moleculară nu este cunoscută. Se presupune că factorul de creștere epidermică (EGF) ar avea rolul de *receptor de virus*. Prima treaptă a dezvelirii este catalizată de proteina de *dezvelire* ce acționează asupra regiunii centrale și dezorganizează componentele stratului extern și a membranei interne. Dezvelirea finală a ADN este catalizată de alte proteine-enzime virale care hidrolizează membrana externă și astfel nucleoidul este eliberat din regiunea centrală. ADN genomic purificat nu este infecțios, deoarece sinteza ARNm este catalizată de *ARN-polimeraza* dependentă de ADN, o enzimă din echipamentul virionului.

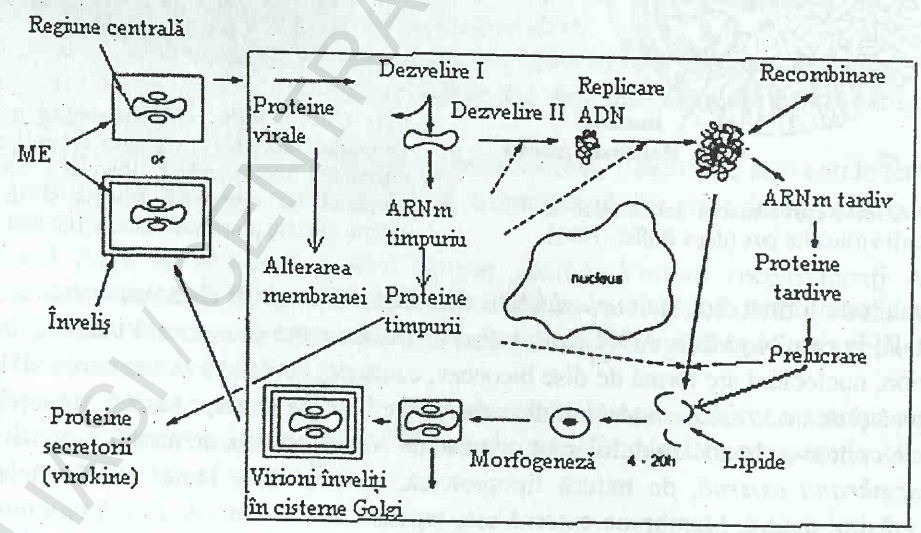


Fig. 426. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a unui poxvirus (după Buller și colab., 1991).

Expresia genelor are loc în 2 faze: timpurie și tardivă. Genele fiecărei faze au promotori caracteristici.

În etapa timpurie este transcrisă circa jumătate din setul de gene și se sintetizează peste 50 de proteine, printre care și proteina de dezvelire. În acest stadiu este stopată sinteza macromoleculelor

specifice celulei. Genele timpurii codifică enzmele implicate în sinteza nucleotidelor (timidin-kinaza, ribonucleotid-reductaza) şi ADN-polimeraza.

Replicarea ADN viral începe în primele 6 ore după infecţie şi furnizează circa 10000 de copii genomice. Replicarea implică mecanismul self-priming. Genomul celorlalte dezoxiribovirusuri are o singură origine a replicării, dar la poxvirusuri, având dimensiuni mult mai mari, prezintă puncte multiple de iniţiere a replicării, ca şi ADN al celulei eucariote. Replicarea începe la ambele capete ale genomului la nivelul *inciziilor monocatenare* produse de o *DN-ază virală* şi progresează prin mecanismul deplasării uneia dintre catenele parentale. ADN progen pare a fi sintetizat prin intermediul unor molecule concatemerice mari.

În ciclul de multiplicare, strâns legate de replicare, au loc evenimente de recombinare între moleculele genomice ale unor tulpini virale diferite (recombinare legitimă) sau recombinare cu molecule de ARN celular (recombinare nelegitimă), fenomen uşurat de absenţa împachetării stringente a ADN. Această particularitate a replicării oferă modalitatea diversificării informaţiei genetice, ceea ce a permis evoluţia şi dobândirea unor funcţii noi. Virusul ce produce fibromul malign al iepurelui pare a fi recombinant între virusul fibromului Shope şi virusul mixoma.

Pentru sinteza replicativă a ADN, poxvirusurile codifică sinteza a cel puţin 2 enzime implicate în metabolismul nucleotidelor: *timidin-kinaza (Tk) şi ribonucleotid-reductaza* (Rr), cu aceleaşi semnificaţii funcţionale pe care enzimele le au la herpesvirusuri. Gena Tk nu este esenţială pentru multiplicarea poxvirusurilor în celulele cultivate. Tk virală se deosebeşte de enzima celulară, dar conferă un avantaj selectiv pentru desfăşurarea ciclului infecţios în celulele care nu se divid şi au o rezervă scăzută de acid timidilic. În celule, activitatea Tk creşte brusc după infecţia cu poxvirusuri.

Ribonucleotid-reductaza (Rr) reduce ribonucleotidele la precursori ai sintezei ADN. ADN-polimeraza este codificată de virus, ceea ce permite desfăşurarea ciclului de multiplicare în citoplasmă. Polinucleotid-ligaza (enzima ce repară breşele în molecula de ADN) creşte de 10 ori în faza timpurie a multiplicării virale.

În faza tardivă a ciclului de multiplicare virală, este transcris restul informaţiei genetice. Genele programului *tardiv* codifică moleculele structurale majore ale virionului. Transcrierea nu este blocată de inhibitorii sintezei proteice sau ai replicării ADN, pentru că enzimele catalizatoare sunt proteine structurale ale regiunii centrale a virionului. Circa 30% din lungimea genomului codifică molecule neesenţiale pentru ciclul de multiplicare virală.

Dinamica procesului de multiplicare a fost analizată atât structural, cât şi prin metode biochimice la virusul vaccinal. Structural, asamblarea virusului începe în *incluzii de tip B*, în care se găsesc virioni în diferite stadii de asamblare.

Asamblarea. Virionii progeni se asamblează în interiorul unor zone ale citoplasmei, difuze sau bine delimitate, alcătuite din material fin-granular, denumite *viroplasmă.* Studiul ultrastructural al multiplicării *virusului vaccinal* a relevat procesul stadial complex al morfogenezei, cu participarea cisternelor aparatului Golgi, care formează învelişul extern al virionilor. Procesul asamblării, complex şi incomplet elucidat, comportă edificarea *de novo* a unor structuri *membranare* destinate să înglobeze o parte din materialele viroplasmei (fig. 427).

Creşterea, turnover-ul şi repararea membranelor celulare se face prin intercalarea componentelor structurale (proteine, lipide) în structurile preexistente. Biogeneza *de novo* a membranelor rămâne una dintre marile probleme ale biologiei. Pentru virusurile pox, există dovada morfologică ce arată că unele componente ale învelişului, sintetizate sub control viral, încep să se condenseze în membrane. Membranele sunt asamblate în focare viroplasmice discrete şi rămân separate de membranele celulare.

Membranele virale sintetizate *de novo* sunt detectabile în matricea viroplasmei şi au structură trilaminară, fiind tapetate la exterior de un strat dens de spiculi. Pe măsură ce membranele cresc, ele înconjură ADN nascent şi proteinele acumulate în viroplasmă.

Primele structuri detectabile electrono-optic în celulele infectate sunt nişte formaţiuni *semilunare* tridimensionale, ce constau dintr-o membrană dublă tapetată cu spiculi proeminenţi, ce formează o bordură în perie pe suprafaţa convexă şi un material granular, adiacent suprafeţei concave. Membranele sunt sintetizate *de novo* şi nu sunt asociate cu nici-un organit celular, ceea ce semnifică

faptul că proteinele trebuie transportate de la locul sintezei, la fabrica de virus. Spiculii conferă rigiditate structurilor semilunare şi determină dimensiunile particulei virale imature. Genomul viral şi proteinele asociate intră în învelişul imatur, înainte ca acesta să se închidă complet.

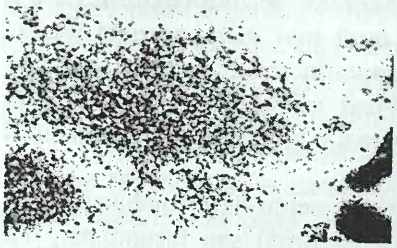


Fig. 427a. Imagine electrono-optică a fabricii de virus în celulele HEp-2 infectate cu virus pox, 120 000, original.

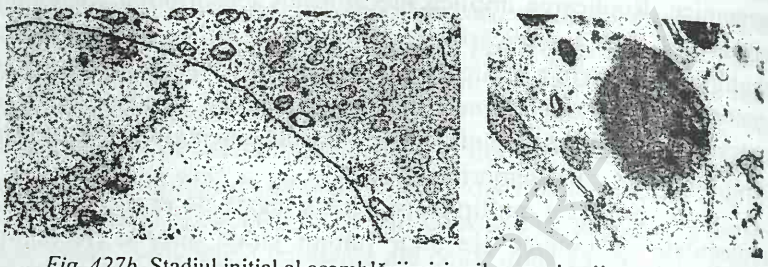


Fig. 427b. Stadiul iniţial al asamblării virionilor pox implică un proces de membranogeneză (stânga, x 66.000). În dreapta, asamblarea virionilor aglomeraţi într-o fabrică de virus, x 150.000 (original).

În interiorul structurilor delimitate de membrana dublă, începe condensarea nucleoidului. Virionii imaturi delimitaţi de membrana dublă asamblată *de novo* (viitoarea membrană internă a virionului matur) sunt transportaţi din aria de asamblare spre periferia celulei. Pe acest traseu, virionii se învelesc cu alte membrane suplimentare. Studiile cito-imunochimice sugerează ca virionii imaturi îşi asamblează membrana dublă externă la nivelul reţelei trans-Golgi, un compartiment intermediar între reticulul endoplasmic granular şi cisternele golgiene. Virionii cu membrana externă dublă (fig. 428, 429), pierd stratul extern al membranei, prin fuziune cu membrana citoplasmatică, pe măsură ce sunt eliberaţi din celulă. Din acest punct de vedere, se poate spune că poxvirusurile se eliberează prin înmugurire, dar la contactul cu membrana se pierde un strat al membranei externe.

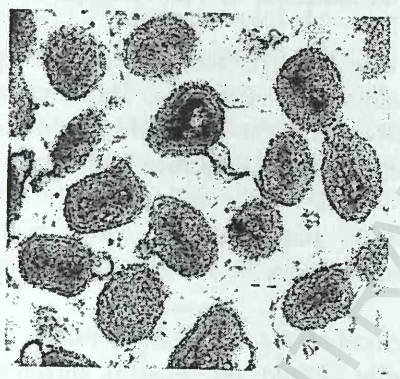


Fig. 428. Imagine electrono-optică a virionilor pox în secţiune. Învelişul extern este conferit de membranele cisternelor Golgi, x 180.000, original.

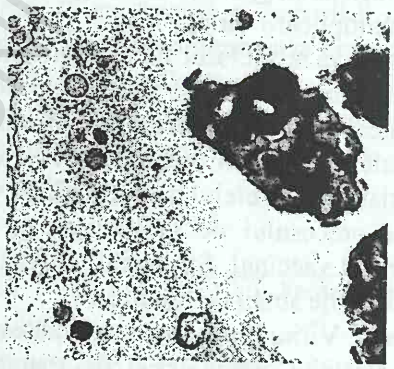


Fig. 429. Entomopoxvirus în celulele glandelor salivare de *Chironomus* sp. În stânga, câţiva virioni imaturi, neînveliţi. În dreapta, incluzii dense în conţinutul cărora se disting virioni, 100.000, original.

Unele poxvirusuri (cowpox, avipox, etc.) produc *incluzii de tip A*. Acestea sunt corpi mari, electronodenşi ce conţin ribosomi.

La electroforeza bidimensională, extractele virus-free din celulele infectate evidenţiază numeroase polipeptide structurale sintetizate în exces, dar şi numeroase proteine "solubile", biologic active, neesenţiale, care interferă cu mecanismele de apărare a gazdei, au rol în virulenţă sau îndeplinesc ambele funcţii. Astfel, s-a identificat *hemaglutinina*, o proteină a învelişului, dar prezentă şi în stare liberă în citoplasma celulei infectate. Foarte importante sunt proteinele din categoria *viroceptorilor*. Termenul semnifică produse genice virale care au omologie funcţională cu receptorii celulari de *citokine* (receptorul pentru IFN-γ, receptorul pentru IL-lβ, receptorul pentru TNF), inhibând mecanismele de apărare a gazdei, stimulate de citokine. Moleculele omologe receptorilor de citokine codificate de poxvirusuri se găsesc numai în formă "solubilă", nefiind componente structurale ale virionilor.

O altă categorie de molecule codificate de poxvirusuri sunt cunoscute sub denumirea de *virokine*. Termenul reuneşte molecule codificate de genele virale, care *au omologie funcţională cu*

citokinele şi influenţează funcţiile celulare într-un mod asemănător. Poxvirusurile codifică omologi ai EGF, un factor de creştere a endoteliului vascular, un inhibitor al serin-proteazei (serpin) ce inhibă activarea citokinelor şi diminuează procesul inflamator, proteine de legare a complementului (receptorul pentru C_4), proteine ce inhibă exprimarea moleculelor CMH I pe suprafaţa celulelor, diminuând recunoaşterea lor de către limfocitele Tc. Printre proteinele care modulează citokinele este o proteină inhibitoare a ICE (proteaza care generează forma activă a IL-1β), un receptor solubil pentru IL-1 care inhibă legarea IL-1β (dar nu legarea lui IL-1α sau IL-1-ra) de receptorul celular pentru IL-1.

Prin complexitatea lor biochimică, prin diversitatea enzimelor pe care le conţin, poxvirusurile se abat mult de la modelul general de structură a celorlalte virusuri. Faptul că ele se multiplică în citoplasmă, fără participarea enzimelor nucleare este o reflectare a complexităţii lor funcţionale. Deşi complexă şi diferită de a celorlalte virusuri, structura lor nu întruneşte particularităţile sistemelor biologice.

ECP. Virusul vaccinal este citocid pentru că inhibă sinteza ADN şi a proteinelor celulare. *Variola* este prima viroză controlată prin vaccinare şi singura eradicată. Variola produsă de virusul sălbatic produce o erupţie (rash) sistemică, febrilă, după o perioadă de incubaţie de 10–14 zile. După incubaţie, în 1–2 zile se produce erupţia tegumentară sistemică cu distribuţie centrifugă: pe mucoasa bucală, faţă, extremităţi şi mai puţin pe trunchi. Erupţia este maculară, dar evoluează în forma pustulară şi veziculară. Leziunile fac crustă şi cad la 14 zile.

Vaccinarea cu virusul vaccinal este eficientă profilactic, dar produce uneori complicaţii generalizate (200 cazuri la un million de vaccinaţi).

Parapoxvirus produce infecţii la ovine, caprine, bovine. Omul se infectează la contactul cu animalele infectate. La caprine şi ovine, parapox produce dermatita pustulară contagioasă (orf). Infecţia se face prin leziuni tegumentare. După infecţie se produce hipertrofia şi proliferarea celulelor epidermice şi infiltrarea leucocitelor.

Molluscum contagiosum (MC) este o tumoră benignă a pielii asemănătoare unui neg, la copiii preadolescenţi, dar poate să apară la adulţii imunocompetenţi, răspândită la populaţia de pe întreg globul. MC este considerată ca o infecţie specifică omului. Nu există dovada transmiterii infecţiei la animale, deşi leziuni asemănătoare s-au identificat la cal. Leziunile MC sunt globulare sau ovalare cu diametrul de 2–5 mm, pot să apară pe toată suprafaţa corpului, cu excepţia epiteliului palmar şi a mucoaselor şi pot fi asociate cu foliculii piloşi. Leziunile sunt mai severe la imunocompromişi şi la cei cu dermatită atopică. Tumorile sunt rezultatul unui proces hiperplazic, strict limitat la stratul epidermic al tegumentului (de aceea sunt clasificate ca acanthoma) şi sunt asemănătoare foliculilor de păr. Din zona centrală a leziunii se eliberează un fluid vâscos cu resturi celulare în care se găsesc virioni. Fluidul disemineză virusul infecţios. Dacă nu sunt perturbate mecanic leziunile MC persistă între 6 luni şi 5 ani la gazdele imunocompetente. Pot să dispară spontan, probabil sub acţiunea efectorilor imunitari. Dacă sunt lezate mecanic, leziunile se vindecă mai repede, dar favorizează suprainfecţia bacteriană. MCV este un indicator al stadiului tardiv al SIDA.

Virusul este transmis prin contactul cu exudatul descărcat din leziunile traumatizate prin acţiune mecanică şi prin contactul direct cu obiectele contaminate. MC este puţin contagios, iar pentru infecţie, doza inoculată trebuie să fie mare. Se transmite prin contact sexual dacă leziunile sunt situate pe sau în vecinătatea organelor sexuale.

Virusul pătrunde în epiderm prin microleziuni. După o perioadă de incubaţie cu durată variabilă, uneori lungă, prin hipertrofia epidermei se formează pustule, apoi un nodul ce se extinde în derm, dar membrana bazală rămâne intactă. În celulele infectate ale stratului bazal se formează incluzii pline cu virioni. Prin îmbătrânire, celulele migrează spre suprafaţă şi sunt înlocuite prin hiperplazia stratului bazal (sunt produse mai multe celule decât cele care se pierd). Celulele care produc MCV sunt hipokeratinizate, dovada unui proces de diferenţiere anormală. Leziunea este delimitată de o capsulă conjunctivă. Histologic, leziunea MCV conţine conglomerate de celule epiteliale hiperplazice într-o indentaţie centrală, organizate în foliculi, în care se multiplică virusul. Întreaga leziune are aspectul unui folicul pilos, în care părul este înlocuit de conglomeratul celular.

În leziunile MC lipsesc efectorii imunitari, în special macrofagele specifice ţesutului tegumentar (celulele Langerhans). Absenţa efectorilor imunitari se datorează sintezei unui factor codificat de virus care blochează imigrarea neutrofilelor şi a moleculelor omologe CMH I, care blochează prezentarea antigenelor virale şi o fac nedetectabilă antigenic.

Virusul MC nu a fost cultivat, dar induce ECP specific în fibroblastele umane primare şi în cele imortalizate. ECP devine evident după 4 ore şi atinge intensitatea maximă la 24 de ore: o proporţie semnificativă a celulelor se detaşează din monostrat, se rotunjesc şi se agregă. La 48–72 ore de la infecţie, celulele aderă de substrat, dar şi-au pierdut morfologia caracteristică şi dobândesc aspectul epitelioid. ECP nu este indus în celulele tratate cu cicloheximidă (un antibiotic inhibitor al sintezei proteinelor – inhibă alungirea catenei polipeptidice) şi nici de preparatul MCV inactivat prin iradiere, ceea ce denotă că MCV transcrie ARNm timpuriu.

Bibliografie

Bugert J. J. 2008. *Molluscum Contagiosum* virus, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Baxby D. 1990. *Poxviruses*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Moss B. 1990. *Poxviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Fenner F. 1990. *Poxviruses*, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Moss B. *Poxviridae:* The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Buller R. M., Palumbo G. J. 1991. Poxvirus pathogenesis – Microbiol. Rev., 1991, 55 (1) : 80–122.

Mihăescu Gr. 1985. Inhibition of some deoxyriboviruses replication cycle in tannic acid pretreated cells. Rev. Roum. Biol. 30, 2, 175–179.

Mihăescu Gr., Mişcalencu D., Ionescu M. D. 1980. Ultrastructural aspects of *vaccinia* virus morphogenesis in L-23 line cells. Rev. Roum. Biol. 25, 1, 69–73.

Mihăescu Gr., Gavrilă L.1988. A *poxvirus* in salivary glands of *Chironomus plumosus*. Rev. Roum. Biol. 33, 1, 15–20.

21.17. Familia Hepadnaviridae

Familia *Hepadnaviridae* cuprinde *virusul hepatitei B*, infecţios pentru om, virusul hepatitei marmotei (*Monax monax*), virusul hepatitei veveriţei *Spermophilus beecheyi* şi virusul hepatitei B la raţa de Pekin. Hepadnavirusurile mamaliene şi cele aviare prezintă diferenţe mari de ordin genetic şi probabil sunt două grupe sau două genuri distincte.

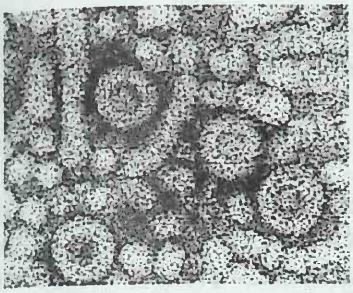
Trăsături comune:

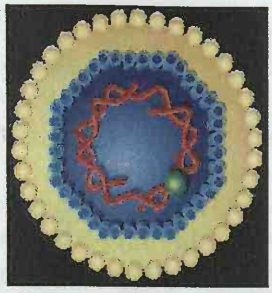
- au un *înveliş proteic*, care înconjură o nucleocapsidă electronodensă, sferică, ale cărei capsomere sunt probabil aşezate după modelul simetriei icozaedrice;
- genomul lor este o *moleculă de ADN* cu dimensiuni asemănătoare;
- au un mecanism unic al replicării ADN, care implică transcrierea inversă a unui ARN viral;
- toate au un *spectru de gazdă foarte îngust* şi un *tropism* foarte evident pentru hepatocite;
- hepatocitele infectate produc şi elimină *cantităţi mari de înveliş viral* neinfecţios, precum şi virioni infecţioşi, până la 500 μg/ml sânge;
- produc infecţii *persistente*, cu viremie ce durează ani de zile, cu efecte citopatice limitate sau absente şi fără leziuni hepatice;
- infecţiile pot fi asociate cu *hepatita acută şi cronică*, cu *carcinom hepatocelular*, dar datorită persistenţei infecţiei şi producerii antigenelor în mare exces, infecţia se poate asocia cu *maladii mediate de complexele imune*;
- *genomul se poate integra în ADN* celular şi infecţia poate rămâne latentă.

Hepadnavirusurile au rol helper pentru VHD, căruia îi furnizează polipeptidele de înveliş.

Structura (fig. 430). Virionii hepatitei B (VHB) au formă sferică, cu diametrul de 42–47 nm. Genomul împreună cu capsida, formează *nucleocapsida* electrono-densă, cu diametrul de 25 nm, acoperită de *învelişul extern,* gros de 7 nm, cu o compoziţie chimică diferită de a peplosului celorlalte virusuri.

Învelişul extern al virionilor constă din circa 240 subunităţi, cu o distribuţie ordonată şi conţine trei *proteine* diferite: *LHBs (*Large), *MHBs* (*M*iddle) şi *SHBs* (*S*mall). Toate formează *antigenul de suprafaţă* al virusului (AgHBs), faţă de care se sintetizează anticorpi neutralizanţi. I se atribuie denumirea de "înveliş", dar este de natură *proteică.*





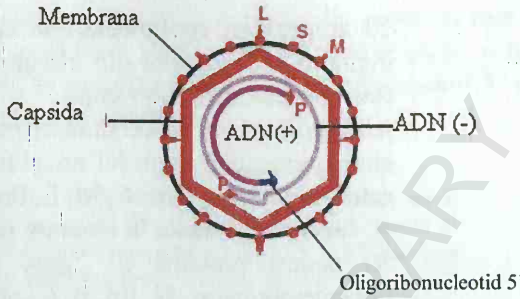


Fig. 430. a. Morfologia particulelor VHB la microscopul electronic pe preparatul colorat negativ: virioni maturi Dane cu diam. de 42 nm, particule filamentoase şi sferice pleomorfe de 20–22 nm, forme ale antigenului HBs (după Harrison şi colab., 2004). b. Reprezentarea schematică a componentelor structurale ale VHB. c. Organizarea genomului VHB.

Toate cele 3 proteine de înveliş conţin *proteina SHBs*, componenta antigenică a învelişului viral: proteina LHBs este alcătuită din subunităţile pre-S_1, pre-S_2 şi S; MHBs conţine subunităţile pre-S_1 şi S, iar SHBs este formată numai din subunitatea S.

Capsida este alcătuită din capsomere identice, care conţin proteina HBc (core), alcătuită la rândul ei, din două subunităţi identice.

Particula virală care conţine regiunea centrală electrono-densă (nucleocapsida), acoperită de înveliş, poartă denumirea de *particula Dane* (1970) şi reprezintă *virionul complet.* Regiunea centrală a virionului se poate elibera sub acţiunea unui detergent neionic (SDS) şi este alcătuită din *Ag HBc* (core) şi *Ag HBe* (endogen), ADN, ADN-pol şi o *protein-kinază.* HBe se găseşte şi în ser ca Ag solubil.

În serul pacienţilor şi al purtătorilor se găsesc alte două tipuri de structuri;

– *unele sferice*, cu diametrul de 15–20 nm, în mare exces cantitativ, adesea fiind singurele structuri în serul purtătorilor;

– altele *lungi*, chiar filamentoase, cu grosimea de 20 nm şi lungimea de până la 200 nm.

Atât cele sferice mici, cât şi cele alungite sunt *particule incomplete*, lipsite de genom. Ele conţin numai proteinele de înveliş, asociate cu lipide: cele sferice conţin numai molecule SHBs şi MHBs, iar cele lungi posedă toate cele trei proteine (LHBs, MHBs, SHBs), componente ale AgHBs. Antigenul HBs s-a numit *antigen Australia* pentru că s-a descoperit în serul unui tânăr aborigen (Blumberg, 1965).

Densitatea virionilor compleţi în serul pacienţilor poate depăşi 10^9 particule/ml, dar împreună cu celelalte forme particulate, în special cele sferice, se realizează densităţi de 10^{13}/ml. Serul pacienţilor (sau al purtătorilor) este infecţios pentru cimpanzeu la diluţii de 10^{-7}–10^{-8}, sau chiar mai mari. Alteori, chiar nediluat, serul nu este infecţios, deoarece lipsesc virionii compleţi. Serurile neinfecţioase conţin numai structurile sferice mici (mai puţin cele filamentoase), cu antigenul HBs.

Virionii infecţioşi trec prin filtrul Seitz, cu pori de 52 nm.

Virionii compleţi sunt rezistenţi la eter, la fenol 0,25% şi îşi păstrează infecţiozitatea după încălzirea la 60° timp de 4 ore, sau după menţinerea la temperaturi scăzute.

Genomul. Hepadnavirusurile au cel mai mic genom ADN, reprezentat de o moleculă de ADN, *parţial dublu catenară*: o catenă completă, de polaritate *negativă,* a cărei secvenţă este complementară faţă de ARNm şi conţine 3000–3300 nucleotide. Catena este deschisă, adică extremităţile sunt libere. La capătul 5' este legat covalent un *polipeptid*, cu rol de *primer* (P) pentru sinteza acestei catene. Din această cauză, capătul 5' nu poate fi fosforilat de polinucleotid-kinază.

Cea de a II-a catenă, de *polaritate pozitivă*, este incompletă şi are o lungime variabilă, între 1100–2600 nucleotide. Pentru sinteza catenei scurte, rolul de primer revine unui *oligoribonucleotid*, de 11–12 nucleotide, legat la capătul 5' al catenei pozitive şi reprezintă capătul 5' al ARN pregenomic, care rămâne nedegradat. La capătul 3' este legată covalent o moleculă de RT (proteina p).

Genomul cu o lungime de 3 kbp, este organizat în *patru cadre* de citire (ORF), parţial suprapuse, toate pe catena completă (negativă), codifică un set de 7 proteine:

– proteina regiunii centrale (*HBc*);

– în sângele unor pacienţi se găsesc nu numai particulele virale complete sau incomplete, dar şi un antigen solubil, *HBe*, *peptidul semnal* al proteinei *HBc,* asemănătoare proteinei C, cu

10 aminoacizi suplimentari la capătul N şi mai scurtă cu 34 aminoacizi la capătul C. Peptidul *HBe* rezultă din clivajul proteolitic al unei proteine precursoare a lui *HBc,* dar funcţia sa nu este cunoscută;

– *ADN-polimeraza* (reverstranscriptaza), al cărei domeniu N-terminal are rol de *primer* pentru sinteza catenei întregi. RT are şi funcţie de RN-ază H;

– setul de proteine *HBs*: S, M, L. Proteina S are 226 aminoacizi, iar celelalte conţin secvenţa S şi secvenţele situate în amonte: pre-S2 (189 nt) pentru proteina M şi pre-S1 (489 nt) şi pre-S2 pentru proteina L. Toate cele 3 proteine de înveliş sunt proteine glicozilate, transmembranare de tip II (capătul N este ancorat în membrana reg). Proteina L este esterificată cu un rest de *acid miristic* la capătul N, necesar infecţiozităţii virale (C. Seeger, 2000). Cadrul de citire al genei S are 3 codoni de iniţiere şi se sintetizează proteinele L, M şi S (L = pre-S1 + pre-S2 + S; M = pre S_2 + S). Particulele Dane conţin toate cele 3 tipuri de proteine. Particulele sferice şi filamentoase, care se acumulează în ser la concentraţii de *câteva sute de micrograme/ml*, conţin o proporţie foarte mare a proteinei S;

– proteina *HBx* (evidenţiată prin prezenţa Ac specifici în serul pacienţilor) este esenţială pentru multiplicarea HBV în organismul gazdă. Rolul ei constă în *activarea indirectă a transcrierii* unor gene celulare, inclusiv a genelor CMH, deoarece stimulează transducerea semnalului. Pentru că nu se asociază cu ADN celular, nu este un transactivator tipic.

Ciclul de multiplicare

VHB nu se multiplică în liniile celulare, dar unele linii pot fi infectate cu ADN de HBV (transfecţie) şi cu VHB al raţei de Pekin. Rezultatele s-au completat cu studii pe ţesutul hepatic uman infectat recoltat prin biopsie.

Receptorii hepatocitului pentru HBV nu s-au identificat. VHB se ataşează prin proteina L, este endocitat şi este eliberat prin fuziunea învelişului proteic cu membrana endosomului. Nucleocapsida este transportată prin porii membranei nucleare, în nucleu, sau capsida se dezagregă la contactul cu proteinele porilor şi în nucleu este transportat genomul nud. Ciclul multiplicării hepadnavirusurilor este *nucleo-citoplasmatic*. Genomul ADN este convertit la ADN dc circular închis, detectabil în nucleul celulei. Conversia ADN genomic circular-relaxat, la ADN circular covalent închis, presupune următoarele modificări:

– *completarea prin sinteză*, a catenei incomplete de ADN genomic (de polaritate pozitivă), catalizată de *ADN-polimeraza virală*, ataşată la capătul 3' al acestei catene;

– *îndepărtarea primerilor de la capetele 5' ale celor două catene: proteina 5' a* catenei complete (de polaritate negativă) şi a *oligoribonucleotidului* de la capătul 5' al catenei de polaritate pozitivă;

– scurtarea catenei complete (–), prin îndepărtarea capătului 5' ce determină regiunea tricatenară;

– *legarea capetelor* celor două catene şi formarea unei molecule dublu catenare închisă covalent. Probabil că aceste etape sunt catalizate de enzime ale celulei. ADN viral nu este replicat în nucleu, chiar dacă mai multe copii genomice ajung ulterior în nucleu.

Genomul dublu catenar, covalent închis, are două posibilităţi de evoluţie:

– cu frecvenţă mică *se integrează* într-un cromosom al celulei şi catena de polaritate negativă este transcrisă de ARN-polimeraza II celulară, în ARN-pregenomic;

– este substratul *transcrierii*: catena de polaritate negativă este transcrisă de ARN-polimeraza II a celulei, în două tipuri de ARN: *ARN pregenomic* (3,5 kb) şi *ARNm monocistronic,* al celor 4 cadre de citire (S, C, P, X) pentru sinteza *proteinelor structurale* majore ale virionului. Toate copiile de ARN sunt bonetate la capătul 5' şi poliadenilate la capătul 3' (fig. 431a).

ARN pregenomic de 3,5 kb este mai lung decât catena genomică (3,2 kb), pentru că o parte a genomului (DR1) este transcrisă de două ori (DR2 şi DR1), astfel că moleculele au secvenţe terminale directe (fig. 431a).

Moleculele de ARN (pregenomic şi mesagere) sunt transportate în citoplasmă. Aici RT se asociază cu o secvenţă de tip *peduncul-buclă* (ε) la capătul 5'al ARN pregenomic şi cu *primerul polipeptidic* (fig. 431b). Pe matriţa de ARN pregenomic (pg), RT catalizează sinteza catenei complete

de *polaritate negativă.* Domeniul N-terminal al proteinei cu rol de primer polipeptidic oferă un rest – *OH al tirozinei* pentru a forma o legătură fosfodiesterică cu dGMP. După sinteza a 4 nucleotide, rolul de primer al proteinei se încheie, deoarece molecula de ADN nascentă este transferată la capătul 3' al ARN pregenomic, unde cele 4 nt se împerechează cu baze complementare.

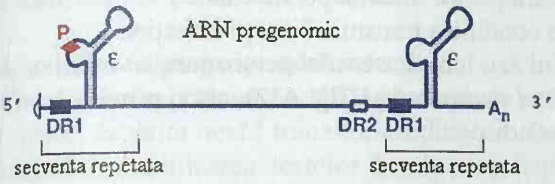


Fig. 431a. ARN pregenomic este mai lung decât molecula genomică de ADN. La cele două capete se găsesc secvenţele peduncul-buclă (ε). P = RT asociată secvenţei buclă-peduncul. Domeniul N-terminal al RT (sau un alt polipeptid) are rol de primer pentru sinteza ADN; DR_2 = secvenţa suplimentară repetată a DR_1.

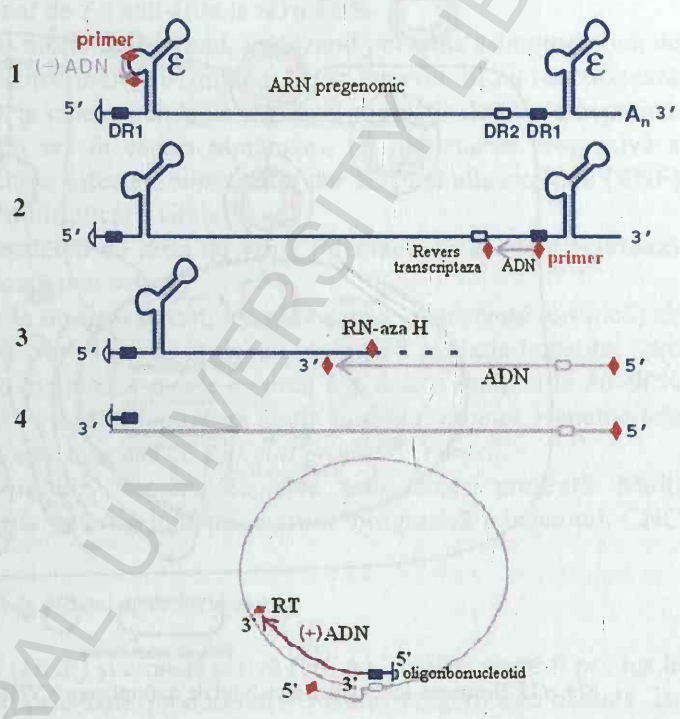


Fig. 431b. Ilustrarea schematică a mecanismului molecular al replicării ADN-HBV. RT se asociază cu secvenţa buclă-peduncul a ARN pregenomic. Un polipeptid are rolul de primer. După sinteza primelor 4 dezoxiribonucleotide, molecula de ADN nascentă, asociată cu polipeptidul primer la capătul 5', sare la capătul opus al matriţei de ARN pregenomic şi se continuă sinteza catenei întregi. Pe măsură ce progresează sinteza catenei de ADN, matriţa de ARN pregenomic este hidrolizată sub acţiunea RN-azei H, activitate asociată RT. Pe catena de ADN se sintetizează cea de a II-a catenă, cu un primer de circa 20 de ribonucleotide (culoare albastră la capătul 5') din molecula de ARN pregenomic. Molecula genomică este formată dintr-o catenă completă, la al cărei capăt 5' este asociată proteina cu rol de primer, şi o catenă incompletă la al cărei capăt 5' este asociat oligo-ribonucleotidul cu rol de primer, iar la capătul 3' este RT (după *John B. Carter* and *Venetia A. Saunders*, 2007).

Sinteza *catenei incomplete, de polaritate negativă*, implică de asemenea o etapă de transfer. Oligomerul ARN de la capătul 3' al ADN este, probabil, un rest al ARN pregenomic rezultat după hidroliză. Rezultatul final al reverstranscrierii este un ADN *relaxat circular* (ADN dc), cu capetele 5' modificate. Circa 10% din totalul virionilor Dane au ADN dc linear.

Moleculele HBs se ancorează cu capătul N-terminal, în membranele r e g.

Molecula de ADN se asociază cu *proteina majoră* (HBc) şi se formează *nucleocapside.* Asamblarea acestora este reglată de cantitatea de proteine HBs. Când cantitatea proteinelor de înveliş este mică, nucleocapsidele pot migra spre *membrana nucleară*, se dezagregă şi eliberează genomul ADN nascent, în nucleul hepatocitului. Genomul se maturează în ADN dublu catenar circular şi este transcris în ARN pregenomic şi ARN mesageri. Astfel se restabileşte cantitatea de genomuri virale (10–50 copii) în nucleu, necesare sintezei proteinelor.

După sinteza proteinelor HBs, nucleocapsidele sunt orientate pe calea secretorie a celulei: în citoplasmă sunt translocate prin înmugurire în lumenul r e g, proces în care sunt *învelite* cu toate cele 3 variante de proteine HBs *inserate* în membranele r e g. Particulele virale urmează calea secretorie a celulei: sunt transferate în cisternele Golgi unde proteina S se maturează prin *glicozilare şi acilare* (cu acidul miristic). Particulele complete şi incomplete sunt transportate, probabil în vezicule, care fuzionează cu membrana plasmatică şi eliberează virionii prin exocitoză la polul vascular al hepatocitului, în torentul sanguin.

Hepatocitul infectat rămâne viabil luni de zile şi eliberează cantităţi mari de virion şi particule neinfecţioase. În liniile celulare infectate productiv nu se observă ECP.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proteinele componente ale învelişului viral (HBs) se sintetizează în mare exces, ele fiind astfel, atât *proteine structurale*, cât şi *nestructurale*. Excesul de proteine HBs nestructurale din sânge are o semnificaţie profundă prin efectele sale:

– *blochează receptorii* specifici ai limfocitelor şi induce *starea de toleranţă* în stadiile tardive ale infecţiei persistente, ca o condiţie necesară pentru infecţia persistentă;

– realizează un *nivel crescut al viremiei*, ca o condiţie a transmisibilităţii infecţiei.

Perioada lungă de incubaţie (câteva saptămâni sau luni, între infecţie şi apariţia virionilor şi a proteinei HBs) s-ar putea explica atât prin *ritmul lent al multiplicării* (fig. 432), cât şi prin *reabsorbţia* imediată a virionilor progeni pe receptorii celulari, încă disponibili.

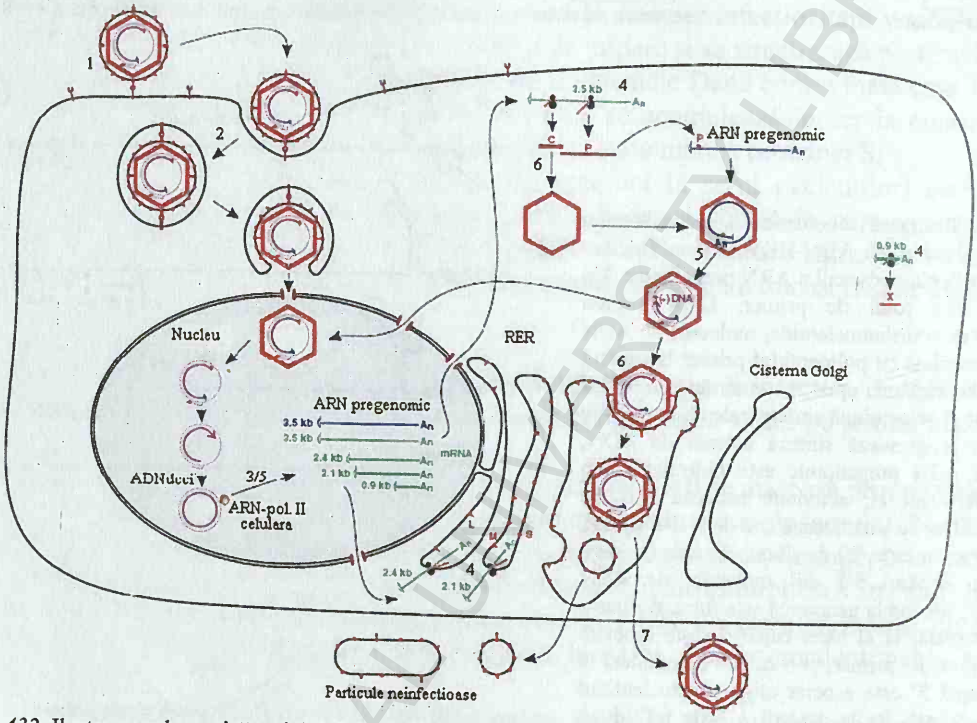


Fig. 432. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a VHB. Amănunte în text (după Carter şi Saunders, 2007).

Proteina HBe se găseşte în sângele purtătorilor înalt producători. Sinteza ei este codificată de ARN care conţine atât gena pentru *proteina HBc*, cât şi o secvenţă "pre c" care codifică *peptidul semnal*, ce orientează peptidul HBc nascent, spre membranele reticulului endoplasmic şi determină *translocaţia HBc în lumen*. Translocaţia HBc în cisternele r e g este incompletă şi permite unei părţi a moleculelor sale să reintre în citosol şi posibil chiar în nucleu. Cea mai mare parte a HBe este clivată la nivelul reticulului sau al cisternelor Golgi şi rezultă proteina de 16–18 kDa din ser.

Virusul hepatitei B umane se poate elibera din celulă în orice moment după asamblarea citoplasmatică, deoarece în sânge se găsesc virioni cu genom hibrid ADN-ARN sau virioni care conţin numai catena ADN de polaritate negativă (genom monocatenar).

ADN viral se replică printr-un mecanism neobişnuit, care implică *transcrierea inversă* a unei copii de ARN pregenomic, mecanism considerat anterior ca fiind unic pentru retravirusuri. De aceea se consideră că Hepadna- ar avea origine comună cu a retravirusurilor, deoarece genomul lor se replică printr-un intermediar. Deosebirea este că Hepadna- împachetează ADN, iar rolul de primer pentru sinteza catenei negative îl are domeniul N-terminal al RT (la retravirusuri, rolul de primer îl are ARNt).

Integrarea nu face parte din ciclul de multiplicare a hepadnavirusurilor, iar ADN-polimeraza virală nu are un situs cu activitate de integrază (spre deosebire de cea retravirală). Totuşi, integrarea ADN viral este un eveniment relativ *frecvent*. ADN viral în stare integrată s-a evidenţiat prin tehnica *hibridării in situ*, în hepatocitele netransformate, în hepatocitele neoplazice umane (CHC) şi ale raţei de Pekin, în liniile celulare derivate din CHC. Secvenţa integrată are dimensiuni *subgenomice*. Integrarea este lipsită de specificitate pentru că are loc în mai mulţi cromosomi.

ADN de HBV integrat este adeseori format din două sau mai multe fragmente, legate cap-coadă sau în alte succesiuni.

După integrarea genomului viral într-un cromosom al celulei hepatice, infecția devine *persistentă* și se sintetizează antigene virale. Integrarea destabilizează genomul gazdei, prin acțiune directă sau este mediată de efectul proteinei HBx asupra antioncogenei p53. Liniile celulare maligne, *in vitro,* elimină particule cu diametrul de 20 nm.

Dinamica procesului infecțios

Infecția primară cu VHB produce, de cele mai multe ori, la tineri și adulți, infecții *inaparente* și rareori *hepatita acută* tranzitorie tipică, cu apariția HBs în sânge, care precede cu 2 sau mai multe săptămâni, modificarea testelor biochimice hepatice. După infecția acută, majoritatea adulților *se sterilizează* în câteva luni. Virusul este eliminat de Ac anti-HBs la titru înalt.

Infecțiile tranzitorii au o durată de evoluție de 1–6 luni, incluzând perioada asimptomatică de incubare, dar poate fi asociată cu viremie la titru înalt (10^{10}/ml). În acest interval, SI nu reacționează sau nu este activat și infecția progresează de la câteva celule, la întreaga populație de celule hepatice. După activarea RI, virusul este eliminat din ser în câteva săptămâni, cu diminuarea progresivă a celulelor infectate. Se presupune că hepatocitele infectate sunt lizate, dar IFNγ și alte citokine (TNF) pot avea rol esențial în stoparea necitocidă a multiplicării virale.

Severitatea infecției acute este dependentă de *doza* de virus infectant. Doza mare scurtează perioada de incubație și produce o hepatită acută mai severă.

La cei care sintetzează Ac anti HBs la un titru scăzut, *infecția devine persistentă* (cronică) *de tip productiv. Persistența* Ag HBs mai mult de 6 luni de la debut semnifică evoluția hepatitei spre *cronicizare*, cu severitate variabilă. *Hepatita* evoluează *cronic* la circa 5% dintre adulți și la 80–90% dintre copiii infectați perinatal acut. Pacienții nu se sterilizează, ci devin purtători *cronici.* Hepatocitele continuă să producă virus. Clinic, persistența este asociată cu *hepatita cronică viremică.*

Titrul viral este mai mare de 1 μg/ml*. Necroza hepatică este rareori prezentă. Mulți dintre pacienții cu hepatită cronică, infectați la vârsta adultă au evoluție progresivă a hepatitei: CHC sau ciroză.

* Trusele comerciale detectează cantități mici, de ordinul ng de Ag viral/ml.

Hepatita cronică poate fi *persistentă* (HCP) și cronică activă (HCA). AgHBs poate fi produs la titru foarte înalt, deși multiplicarea virală propriu-zisă (producerea virusului progen) este blocată, iar evoluția procesului patologic este favorabilă: lipsește infiltrarea leucocitară. Explicația sintezei AgHBs în absența multiplicării virale detectabile este că *ADN viral se integrează* într-un cromosom al celulei. Din provirusul integrat este transcris numai ARNm pentru HBs, iar secvențele pentru ARNm *pol* și pentru *proteina c* sunt represate. Pe de altă parte, ADN integrat poate fi rearanjat, înainte sau după integrare. Indivizii cu titru viremic înalt (10^9–10^{10}/ml) au RI de mică intensitate, iar procesul patologic este atenuat și invers, cei cu titru antigenic mai mic (10^7–10^8) au proces patologic mai intens.

La pacienții cu *hepatită cronică activă* (HCA) se asamblează virus complet și în ser se evidențiază HBe. În serul pacienților se detectează Ac anti-HBc și anti-HBe.

Infecția cronică prezintă un risc crescut de *evoluție cirotică** sau *CHC.*

* *Ciroza* este o fibroză hepatică ireversibilă și se caracterizează prin apariția nodulilor regenerativi, formați din hepatocite și fibroză difuză. Dimensiunile nodulilor cresc odată cu progresia cirozei. Rata progresiei este foarte variabilă. În faza cirotică fluxul sanguin este alterat: crește tensiunea portală și apar varice esofagiene. Sinteza proteinelor hepatice și metabolismul intermediar sunt alterate sever. Creșterea tensiunii portale favorizează acumularea lichidului ascitic în cavitatea abdominală. Ciroza este un risc major pentru dezvoltarea CHC.

Peste 300 de milioane de persoane sunt infectate persistent cronic. Infecția cronică este asociată cu leziuni de diferite grade, de la cele foarte ușoare, până la cele severe.

Deși s-a considerat că VHB este strict *hepatotrop*, ADN, ARN și Ag virale s-au găsit în celulele epiteliale ale ductelor biliare, în pancreas, rinichi, cortexul suprarenalelor, tegument, macrofage, splină, măduva osoasă.

O mică proporție a *limfocitelor B* infectate latent, devin permisive pentru multiplicarea virală. Virionii progeni reinfectează celulele epiteliale ale orofaringelui și astfel virusul se propagă în populația umană. În infecția cronică a epiteliului nazofaringian, virusul este protejat de sistemul imunitar, datorită inaccesibilității limfocitelor T.

Variabilitatea antigenică. Izolatele de VHB au fost tipizate serologic pe baza reactivității Ag HBs. HBV umane cuprind 6 *genotipuri*: A --- F, care diferă prin 8–15% din secvența de nt. Existența genelor suprapuse împiedică variabilitatea excesivă.

Mutantele HBV sunt consecința erorilor de replicare a genomului. Deoarece infecția umană cu HBV durează mai mulți ani sau decade, schimbările bazelor se acumulează și produc mutante. Toate variantele au un determinant comun localizat pe proteina S de 226 aminoacizi, în secvența 111–156.

Patogeneză

Mecanismul producerii leziunilor hepatice este incert. HBV nu pare a avea ECP direct asupra hepatocitului. Apariția HBs în sânge nu este asociată cu ECP, ceea ce se corelează cu absența hepatitei clinice la purtătorii care produc numai HBs. Totuși, acumularea excesivă a Ag HBs în hepatocite poate produce citoliza.

Maladia inflamatorie a ficatului este cauzată de RI al gazdei față de Ag virale. RI anti-HBV este viguros, policlonal și multispecific, pentru toate proteinele virale, la pacienții care se sterilizează și mai puțin intens la pacienții infectați cronic, care nu se pot steriliza.

Celulele Kupffer din pereții capilarelor sinusoide au rolul de CPA și prezintă Ag virale HBc și HBs în asociație cu moleculele CMH II. Informația antigenică este preluată de limfocitele TCD_4. Acestea secretă citokine (IL-2, IFNγ, TNFα) stimulatoare ale RIMC sau citokine (IL-4, IL-10) stimulatoare ale RIMH. Limfocitele B se diferențiază și sintetizează Ac anti HBs neutralizanți ai virionilor, iar limfocitele Tc recunosc epitopii virali expuși pe membrana hepatocitului în asociație cu moleculele CMH I și exercită efect citolitic față de hepatocite sau inhibă multiplicarea VHB, fără liza hepatocitului. Multe celule sunt lizate înainte de a elibera virus.

Anticorpii elimină virionii liberi, iar IMC elimină celulele infectate. Diseminarea virusului la alte celule sensibile este controlată de Ac specifici neutralizanți. Protecția locală este de asemenea conferită de IFN și de alte citokine, care pot induce rezistența celulelor învecinate celor infectate.

Reactivitatea IMC în faza acută este decisivă pentru evoluția infecției: organismul se sterilizează sau infecția se cronicizează.

In vitro, limfocitele circulante ale pacienților cu hepatită B au efect citotoxic față de hepatocitele autologe. Efectul citotoxic este blocat de Ac anti-HBc, ceea ce sugerează că Ag HBc este expus pe suprafața hepatocitelor și poate fi ținta limfocitelor Tc. HBc poate fi toxic pentru celulă, probabil datorită asocierii sale cu ADN.

Patogeneza infecției cu VHB este nu numai directă, consecință a infecției, ci este și *secundară*: complexele imune se depun în special în glomerulii renali, unde inițiază procese inflamatorii cu efect distructiv.

Hepatita acută constă în necroza multifocală a celulelor parenchimatoase și inflamație periportală histiocitară. Rețeaua de reticulină a ficatului este bine păstrată, cu excepția cazurilor de necroză masivă. Celulele hepatice arată modificări necrotice de intensitate diferită, în special în aria centrolobulară. Necroza tinde frecvent să fie zonală. Celulele hepatice moarte sau care mor sunt extruzate în spațiul perisinusoidal. Celulele Kupffer și celulele endoteliale proliferează și adeseori conțin lipofuscină (un pigment degenerativ).

Circa 0,2% dintre cazurile clinice de hepatită acută sunt foarte severe, cu insuficiență hepatică gravă în câteva zile, comă hepatică, adeseori fatală. Supraviețuitorii se recuperează complet și devin imuni la HBs și HBc. Cazurile fulminante sunt adeseori asociate cu infecția cu HDV sau cu alte virusuri hepatitice, cu epurarea rapidă a Ag HBs și HBe și depunerea în rinichi, producând insuficiența renală, la care se adaugă leziunile ample pe care le produce RIMC excesiv de intens. În contrast, pacienții imunocompromiși fac o hepatită subclinică asociată cu persistența virală.

Hepatita B acută și cronică, histologic se caracterizează prin *infiltrare limfocitară* (în special cu limfocite Tc), reacție inflamatorie, liza hepatocitelor urmată de regenerare. Limfocitele Tc stimulează celulele inflamatorii nespecifice: PMNN, monocite. Se eliberează citokine care mențin și

amplifică focarul inflamator. Rezultatul răspunsului inflamator este moartea *apoptotică* a hepatocitelor indusă de citokine sau moartea *necrotică*. Rata fiziologică a reînnoirii hepatocitelor este de 6–12 luni, iar la pacienții infectați cu HBV, rata regenerării este de câteva ori mai mare.

Teste biochimice ale funcției hepatice. Nivelul seric al ALT, AST și al altor enzime eliberate de celulele hepatice se corelează direct cu numărul celulelor lezate și este mai înalt la pacienții cu hepatita acută. Valoarea bilirubinei în urină este mai mare. Nivelul bilirubinei libere și conjugate în ser crește.

Numărul leucocitelor sanguine este normal.

Epidemiologie

Hepatita B este o problemă majoră de sănătate publică. *Un milion* de oameni mor anual de hepatita cronică B și sechele.

Circa 50% din populația globului are experiența contactului antigenic cu HBV și circa 10% este infectată *persistent*, adică sunt purtători de virus. VHB s-a găsit chiar în sângele unor indivizi care nu au prezentat niciodată semne clinice de infecție, dar pot să fie purtători viremici timp de ani de zile.

Circa 10% dintre adulții infectați și peste 90% dintre copiii născuți de mame HBe pozitive devin purtători cronici. Examenul biopsiei relevă semnele HCA. În contrast, purtătorii pozitivi pentru HBs, care nu au avut hepatită clinică, au în special HCP sau histologia hepatică este normală. Acești purtători au fost, probabil, infectați în perioada neonatală, când este indusă starea de toleranță față de Ag HBs datorită imaturității sistemului imunitar.

Purtătorii au un risc de 223 de ori mai mare de ciroză hepatică și de 100 de ori mai mare de a face CHC.

Virusul poate produce hepatita serică numai după inocularea parenterală.

Transmiterea VHB se face prin sângele contaminat și derivatele lui, prin folosirea acelor și seringilor contaminate, transplacentar (dacă sângele matern are titru viral înalt), dar și perinatal (în timpul expulziei fetale) și chiar prin lichidul spermatic. Transmiterea cea mai eficace este prin contactul virusului cu mucoasele. Tegumentul intact este impermeabil, dar virusul poate pătrunde prin rănile deschise.

Dacă titrul infecțios este foarte mare (10^8 particule/ml ser), cantități foarte mici de ser sau ale diferitelor secreții (salivă, lichid spermatic, secreție vaginală, sânge menstrual) pot transmite infecția cu VHB. În absența particulelor virale complete, fluidele nu sunt infecțioase.

Dacă serul unui purtător de VHB are un titru infecțios de 10^9 particule/ml, *1 nl* (o cantitate invizibilă) conține 100 doze infecțioase și transmite infecția prin seringă.

VHB nu se găsește în scaun și nu este infecțios după administrare orală.

Contactul heterosexual este o cale relativ eficientă de transmitere. Transmiterea este mai frecventă între bărbații homosexuali. Mușcătura este o cale eficientă de transmitere, dar sărutul este inofensiv.

La titruri infecțioase $<10^6$ pv infecțioase/ml, transmiterea se face numai prin seringa contaminată. La acest titru, virusul nu străbate bariera placentară. De la mama infectată persistent, la naștere virusul trece la nou-născut odată cu ruperea vaselor de sânge ale placentei sau prin secreția lactată. Copiii infectați perinatal sunt imunotoleranți la antigenele virale și au un risc de circa 90% de a face o infecție persistentă pentru toată viața. În regiunile cu endemism înalt (peste 8% dintre indivizi sunt infectați persistent), virusul se menține prin transmiterea de la mamă la făt.

Contactul școlar sau profesional nu prezintă risc de transmitere, chiar la titru înalt. Nu se transmite prin ciclul fecal-oral.

Perioada de incubație este de 45–160 de zile. Simptomele sunt nespecifice: vomă, anorexie, senzație de oboseală, mialgie, apatie, stare de rău general și sunt urmate uneori de *icter*. Rareori, icterul apare fără perioada prodromală.

HBV produce ECP minim și, la indivizii imunotoleranți, virusul este produs în cantitate mare pentru perioade lungi, dar leziunile hepatice sunt minime. Multiplicarea virusului mărește riscul integrării ADN viral și implicit al transformării neoplazice.

Persoanele care au avut hepatită nu vor dona sânge, deși virusul se poate găsi chiar la persoanele clinic sănătoase.

Depozitarea prelungită a plasmei (câteva luni) la temperatura camerei diminuează riscul infecției: 0,01 ml plasmă infectată, poate transmite infecția. De aceea, în amestecul de plasmă, un singur purtător poate infecta o cantitate foarte mare de plasmă.

Vaccinare. HBs purificat de la purtători și inactivat cu pepsină, uree, formol, se folosește ca vaccin.

Vaccinul cu *HBs* obținut prin *inginerie genică* (gena se clonează în celulele de levuri sau în celule mamaliene) a conferit protecție față de infecție. Doza standard este de 10–20 μg, adsorbită pe hidroxid de Al (ajuvant) și o substanță antibacteriană. De obicei, la adulți se aplică 3 doze: a II-a, la o lună după prima și a III-a, la 6 luni.

Diagnosticul VHB se bazează pe *creșterea nivelului ALT*. Valorile sale cresc de la limita superioară normală de 22 UI/L pentru bărbați și de 18 UI/L la femei, la 25°, la 300 UI/L – până la *câteva mii UI/L* în cazurile severe.

Nivelul ALT indică gradul leziunilor hepatocitelor, crește brusc la sfârșitul fazei prodromale și atinge valoarea maximă cu puțin înainte de apariția icterului. În infecția cronică, nivelul ALT crește moderat.

Cel mai evident marker serologic al hepatitei B acute este *IgM crescut*, anti-HBc. Diagnosticul infecției în *faza acută* este confirmat prin detectarea antigenului HBs sau prin evidențierea titrului crescut al Ac anti-HBc: IgM anti-HBc se sintetizează timpuriu și este un marker sigur al infecției acute curente, iar IgG anti-HBc indică o infecție anterioară.

Deoarece este asociat cu HBc și cu ADN, *evidențierea HBe* este un test fidel al infecțiozității sângelui.

Pacienții cu HBs persistent în ser pentru mai mult de 6 luni sunt purtători, de risc înalt sau scăzut, în funcție de prezența, respectiv absența Ag HBe.

Existența HBc pe celulele hepatice și a HBe seric este indiciu pentru o hepatită activă. Sinteza lor este asociată cu creșterea titrului Ac specifici.

Recuperarea totală este marcată de scăderea ALT la valori normale și negativarea pentru Ag HBs.

Scopul terapiei este reducerea nivelului viremiei și ameliorarea funcției hepatice. Tratamentul se bazează pe *IFNα* și *lamuvidină*. IFNα administrat mai mult de 3 luni este eficace pentru 30% dintre pacienții cu infecție cronică. Pacienții cu concentrații mici de ADN viral în ser răspund mult mai bine decât cei cu concentrații înalte. Remisiunile sunt de lungă durată, asociate cu pierderea Ag HBe și HBs.

Lamuvidina, un analog nucleozidic, inhibă RT virală și a înlocuit IFNα ca medicament de primă linie, deoarece este mai sigur. Administrată timp de 12 luni, scade concentrația de ADN viral, ameliorează histologia ficatului, deoarece, ca și ribavirina administrată pentru tratamentul hepatitei cu virus C, pare să aibă efect imunosupresor (C. Seeger, 2000), iar enzimele hepatice revin la valori normale. După administrare de circa 1 an, variantele rezistente la lamuvidină refac populația de virioni.

Neoplazia hepatică. Riscul de neoplazie la persoanele infectate cronic cu HBV este de 10–25%. ADN viral integrat în tumori are, probabil, un rol direct în oncogeneză, dar 20% din totalul tumorilor CHC de la purtătorii Ag HBs sunt negative pentru ADN viral, ceea ce sugerează că în oncogeneză sunt implicate alte mecanisme. Integrarea ADN viral în ADN celular este aleatorie, fără secvențe specifice.

ADN viral integrat poate fi detectat în ficatul unor pacienți cu sau fără multiplicare virală. Neavând specificitate de *situs*, metoda hibridării poate fi folosită pentru detectarea ADN viral numai după expansiunea clonală a celulelor în care s-a integrat ADN. Generarea clonei este primul stadiu în geneza CHC produs de micotoxine. Intervalul lung între infecția virală inițială și dezvoltarea tumorii este compatibilă cu conceptul expansiunii clonale a hepatocitelor în care s-a integrat ADN viral.

Prin analogie cu modelul activării oncogenelor prin mutageneză de inserție, indusă de virusurile oncogene ADN, s-a presupus că la rața de Pekin, virusul se integrează lângă sau la N-myc2, o pseudogenă a N-myc și stimulează activarea transcrierii N-myc2.

Neoplazia hepatică este aproape totdeauna asociată cu ciroza la vârsta de 20–40 de ani.

Producerea HBs în ficatul purtătorilor la care multiplicarea virală s-a stopat, ca și în multe tumori, sugerează că ADN viral integrat este transcris și tradus. Funcționalitatea acestui

promotor argumentează ipoteza perturbării transcrierii genelor celulare ce pot să ducă la pierderea controlului creşterii.

Un alt mecanism al transformării maligne ar putea fi prin expresia unei oncogene, activată de genomul viral integrat. Genomul HBV nu conţine o astfel de genă, dar gena x codifică un transactivator al transcrierii şi probabil proteina oncogenei celulare perturbă controlul transcrierii.

Bibliografie

Robins W. S. 1991. *Hepadnaviridae* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Seeger C., Mason W. S. 2000. Hepatitis B Virus Biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 60, no. 1, pp. 51–68.

Blonstein A. 1993. *Hepatitis B Virus*. Karger Gazette, no. 57.

Howard C. R., Zuckerman A. J. 1990. *Viral Hepatitis*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Chisari F. V. 1995. *Hepatitis B* Virus Immunopathogenesis. Annu. Rev. Immunol., 13: 29–60

Sherker A. H., Marion P. L. 1991. *Hepadnaviruses* and Hepatocellular Carcinoma. Annu. Rev. Microbiol. 45: 475–508.

Thomas H. C., Waters J. A. *Hepatitis B* Virus, Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Ganem D. 1996. *Hepadnaviridae* and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott -Raven Publishers, Philadelphia.

Feitelson M. 1992. *Hepatitis B virus* infection and primary hepatocellular carcinoma. Clin. Microbiol. Rev. 5, 275–301.

Valsamakis A. 2007. Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B. Clin. Microbiol. Rev. 20: 426–439.

Harrison T. J., Dusheiko G. M., Zuckerman A. J. 2004. *Hepatitis Viruses*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Harrison T. J. 2008. *Hepadnaviruse: General Features*, în vol. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology, editors Brian W. J. Mahy, Marc H. V. van Regenmortel, Academic Press.

Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.

21. 18. Familia Retraviridae

Structura şi multiplicarea retravirusurilor

Retraviridele sunt o familie mare de virusuri infecţioase pentru vertebrate, foarte importante pentru patologia umană şi animală, dar şi instrumente de studiu experimental de o valoare remarcabilă. Ele au o organizare structurală şi genetică uniformă, dar manifestă o gamă largă de interacţiuni cu gazdă, de la *infecţii benigne* produse de *virusurile endogene*, infecţii moderat patogene produse de cele *exogene*, până la consecinţele fatale ale infecţiei cu virusul imunodeficienţei şi ale celor rapid oncogene.

Retravirusurile se disting prin următoarele proprietăţi funcţionale:

- genomul retraviral, sub forma unei catene duble de ADN, se integrează ireversibil ca *provirus* într-un cromosom al celulei gazdă;
- unele au capacitatea de a încorpora secvenţe de ADN din celulă, considerate ca *oncogene*. Studiul interacţiunii retravirusurilor cu celula a permis explicarea moleculară a mecanismului oncogenezei;
- modifică activitatea genelor adiacente situsului de integrare a provirusului.

Structura virionului

Virionul este învelit, de formă sferică, cu diam. de 100– 130 nm. Nucleocapsida (regiunea centrală) are formă nedefinită (sferică, alungită, conică) şi include genomul şi 3–4 proteine, cu rol catalitic în ciclul de multiplicare.

Capsida este formată din proteina capsidală (p24) distribuită în cele circa 390 de capsomere, aşezate după modelul simetriei *icozaedrice*. Fiecare capsomeră este formată prin agregarea mai multor polipeptide, de 3–4 tipuri.

Genomul ARN (două molecule identice) este asociat cu câteva proteine virale (*o protează, revers-transcriptaza* (RT), *integraza* şi proteina *nucleocapsidei* (NC, p9). Genomul este împachetat strâns în capsidă, iar după dezagregarea blândă a virionului devine filamentos.

Proteina *matriceală* (MA, p17) acoperă nucleocapsida. În interiorul matricei se găsesc proteinele accesorii *Nef, Vpr, Vif, Vpu.*

Nucleocapsida este acoperită de *peplos*, format din dublul strat fosfolipidic, de origine membranară, în care sunt inclavaţi spiculii glicoproteici, codificaţi de virus, cu formă prismatică şi butonată. Spiculii sunt formaţi din 3 heterodimeri ai proteinei TM (41 kDa) şi ai proteinei SU (121 kDa). Pe suprafaţa virionului proemină 7–14 spiculi. Învelişul este dobândit în cursul maturării virionilor, prin înmugurire din membrana citoplasmatică (fig. 433).

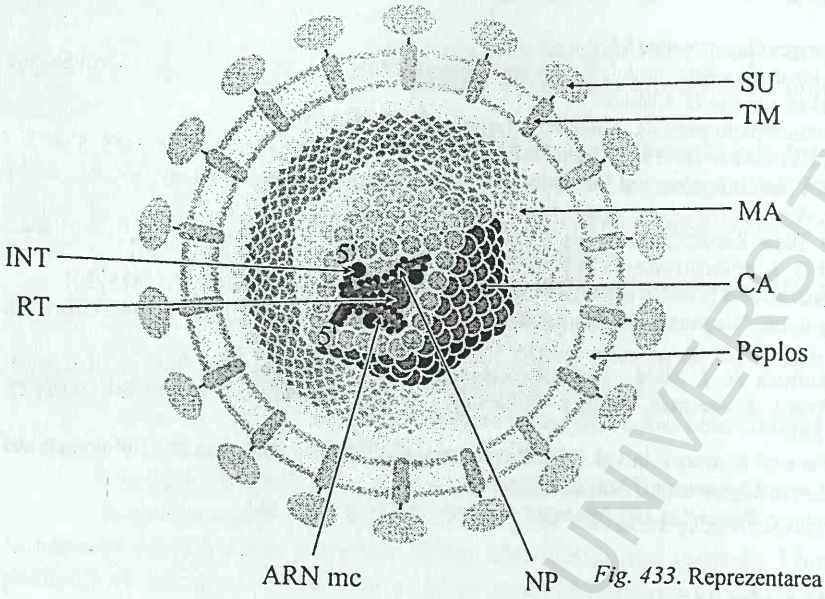


Fig. 433. Reprezentarea schematică a structurii unui retravirus.

Clasificare. Familia *Retraviridae* a fost împărţită în 3 subfamilii pe baza criteriilor de patogenitate: *Oncovirinae, Lentivirinae* şi *Spumavirinae.* O clasificare recentă propune divizarea oncovirinelor în 5 genuri:

- *Alpharetravirus* (virusurile leucozei şi sarcomului aviar);
- *Betaretravirus* (virusul tumorii mamare a şoarecelui – MMTV);
- *Gamaretravirus* (virusurile leucemiei şi sarcomului mamalian);
- *Deltaretravirus* (virusul limfotropic T uman şi virusul leucemiei bovinelor);
- *Epsilonretravirus* (virusul infecţios al peştilor);
- *Spumavirus* (produce degenerarea 'spumoasă' a celulelor infectate, dar nu este asociat cu procese patologice cunoscute);
- *Lentivirus* (virusuri ce produc infecţii cronice, cu progresie neurologică lentă).

Virionii acestei familii se descriu după mai multe criterii:

- în funcţie de *tipul structural* (tip A, B, C, D);
- de receptorul celular care mediază pătrunderea;
- de modul de propagare (exogene şi endogene);
- după prezenţa sau absenţa unei *oncogene* în genomul lor.

Retravirusurile *exogene* se transmit pe orizontală, se comportă ca agenţi infecţioşi propriu-zişi şi se găsesc numai în celulele infectate, iar cele *endogene* se găsesc ca provirus integrat în ADN în celulele somatice şi germinale şi se transmit pe verticală, prin mecanisme mendeliene, de la o generaţie la alta prin celulele liniei germinale. Informaţia genetică virală este o componentă constantă a genomului fiecărei celule, deoarece provirusul integrat se comportă ca un grup de gene controlate de

celulă. Multe vertebrate, inclusiv omul, posedă copii multiple ale ARN viral. Virusurile endogene nu sunt patogene pentru gazdă şi nu transformă celulele *in vitro*.

Tipul *structural* (particule de tip A, B, C, D) de clasificare a retravirusurilor are la bază aspectul electrono-optic al virionilor şi al precursorilor lor în celula infectată.

Particulele de *tip A* sunt nucleocapside de formă sferică, asamblate în citoplasmă, înainte de înmugurire.

Particulele de *tip B* se formează prin învelirea particulelor de tip A la nivelul membranei citoplasmatice.

Nucleocapsida particulelor de *tip C se asamblează treptat*, pe măsură ce înmugurirea progresează (co-asamblare).

Particulele de *tip D* rezultă prin înmugurirea nucleocapsidelor preasamblate, ca şi particulele de tip B, dar regiunea internă are aspect tubular.

Subfamilia *Oncovirinae* cuprinde mai multe grupuri de virusuri:

– grupul virusurilor aviare, care induc leucoze şi sarcoame, include virusuri exogene şi endogene (virionii sunt de tip C);

– grupul virusurilor mamaliene de tip C include virusuri endogene şi exogene infecţioase pentru rozătoare, carnivore, primate. Unele tulpini de virus conţin gene oncogene;

– *grupul HTLV-BLV* (*H*uman *T (bovine B) l*ymphotropic *v*irus) cuprinde virusuri exogene care produc limfoame ale limfocitelor T la om şi ale limfocitelor B la bovine.

Oncovirinele induc malignităţi din categoria *sarcoamelor, leucemiilor, limfoamelor* şi *carcinoamelor mamare*. Sunt infecţioase pentru o largă diversitate de specii, de la peşti până la om.

Subfamilia *Lentivirinae* cuprinde virusuri exogene ce produc maladii neurologice şi deficienţe imunitare, fără a fi implicate direct în producerea malignităţilor: HIV 1, HIV 2, virusurile imunodeficienţei bovinelor (BIV), felinelor (FIV), maimuţelor (SIV), virusul artritei şi encefalopatiei caprinelor (CAEV), virusul pneumoniei progresive a ovinelor (maedi) şi virusul Visna, virusul anemiei hemolitice a calului etc. Virusurile Visna şi maedi produc infecţii cu evoluţie lentă la ovine. Virusul Visna infectează toate organele, dar modificările patologice sunt limitate în primul rând la SNC, plămân, celulele SFM. SNC se infiltrează cu celule inflamatorii, curând după infecţie, dar perioada de incubaţie este lungă (de ordinul anilor), înainte de apariţia simptomelor neurologice. Maladia poate să progreseze rapid, în câteva săptămâni, sau lent, în câţiva ani.

Subfamilia *Spumavirinae* cuprinde virusuri care produc infecţii persistente, cu vacuolizarea celulelor *in vitro*. S-au izolat de la om şi de la primate. *In vivo* nu produc îmbolnăviri cunoscute şi definite clinic.

Cele mai studiate sunt *virusul sarcomului Rous* (*VSR*) şi *virusul leucemiei aviare* şi *murine*. VSR nu este un virus natural, deoarece nu persistă în populaţiile animale, ci este o creaţie de laborator, transferată şi păstrată de virologi.

Organizarea genomului

Genomul retravirusurilor are câteva particularităţi unice:

– este singurul *genom diploid* ;
– este singurul replicat şi prelucrat de aparatul de transcriere şi replicare a ARNm celular;
– este singurul asociat cu ARN specific celulei, a cărei funcţie este *iniţierea replicării*;
– este singurul genom ARN de polaritate pozitivă, care *nu funcţionează ca ARNm*.

Genomul retravirusurilor are o structură *dimerică*. După extracţia din virioni, fără denaturare, proprietăţile fizice (sedimentare, mobilitate EF) denotă că genomul are dimensiuni duble faţă de moleculele denaturate. Cele două molecule au secvenţe identice de baze (35 S fiecare) şi formează un ansamblu de 70 S. Probabil au numeroase puncte de asociere, necovalente, dar cel mai stabil este la capătul 5' al fiecărui genom.

Semnificaţia diploidiei retravirusurilor nu este cunoscută, dar una dintre consecinţe este rata foarte înaltă a evenimentelor de *recombinare* ceea ce permite repararea eficientă a leziunilor fizice ale genomului.

La capătul 5', ARN viral este *bonetat* sub forma m7GpppGmp, este metilat la nivelul unor resturi de adenină (metilări interne), iar la capătul 3', genomul conţine o secvenţă de circa *200 resturi de poli-A*, o modificare tipică celor mai multe ARNm de la eucariote.

Genomul (fig. 434) este asociat cu alte molecule, care se evidenţiază după denaturarea genomului nativ: *ARNt şi ARN de tip ribosomal*. Cea mai importantă este unica moleculă de ARNt/genom, asociată cu o secvenţă complementară, aproape de capătul 5' al genomului. ARNt funcţionează ca *primer*, la nivelul căruia RT iniţiază sinteza ADN. Funcţia celorlalte tipuri de ARN din virion nu este cunoscută.

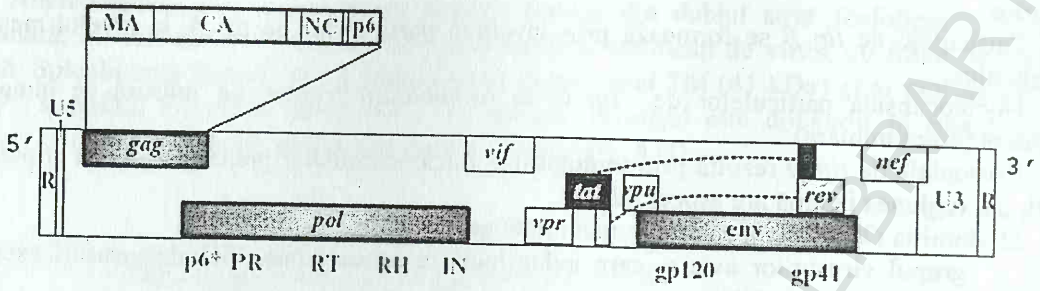


Fig. 434. Organizarea genomului retraviridelor (după Carter şi col., 2007).

În regiunile terminale ale genomului se găsesc secvenţele necodificatoare, cu rol de *semnale* pentru sinteza ADN sau ARN şi pentru prelucrare, iar *regiunile interne* au funcţii de codificare a proteinelor. Incepând cu capătul 5', secvenţele comune tuturor retravirusurilor sunt:

- *secvenţele R* (*R*edundant), cu o lungime variabilă de 12–135 de baze, sunt identice la ambele capete ale genomului, la toate retravirusurile şi au rol important în procesul transcrierii inverse, deoarece permit transferul ADN nascent, de la un capăt la celălalt al matriţei de ARN genomic;
- *secvenţa U_5* este prima copiată în ADN, în transcrierea inversă şi devine capătul 3' al secvenţei lungi repetată terminal (*LTR* = *L*ong *T*erminal *R*epeats), ce flanchează catena ADN. Secvenţa LTR ce conţine promotorul şi alte elemente reglatoare este divizată în 3 secvenţe: U_3, R, U_5. U_3 controlează transcrierea provirusului, bonetarea şi poliadenilarea ARNm;
- *secvenţa PB* (*P*rimer *B*inding) este formată din 18 nucleotide şi constituie situsul de ataşare a primerului ARNt, pe baza unei complementarităţi perfecte;
- *secvenţa L* (Leader) precede prima regiune tradusă şi are cel puţin două funcţii: a) este situsul de iniţiere pentru transcrierea tuturor tipurilor de ARNm înnădite; b) are rolul semnalului de împachetare a genomului în virion;
- *regiunea codificatoare* începe cu gena *gag* şi se termină cu gena *env* şi este tradusă în întregime. Se produce chiar o suprapunere a cadrelor de citire. Regiunea tradusă conţine semnale interne, cu rol de situsuri de înnădire, de unde se formează diferite tipuri de ARNm;
- *secvenţa PP* (*P*oli*p*urinică) conţine cel puţin 9 resturi de A şi G. Aici se iniţiază sinteza catenei ADN de polaritate pozitivă;
- *secvenţa U_3* (*U*ntranslated), netradusă, este simetrică secvenţei U_5 şi devine capătul 5' al LTR, care flanchează catena de ADN. Secvenţele LTR au rol în integrarea ADN viral în cromosomul celulei.

Regiunea codificatoare cuprinde gene care codifică proteine, aşezate în aceiaşi ordine la toate retravirusurile.

Pe baza complexităţii genomului şi a mecanismului de multiplicare se disting retravirusuri *simple* şi *complexe*. Cele simple au genomul format din cele 3 gene esenţiale: *gag, pol, env*. Lentivirusurile au un genom mai complex: *gag, pol, env*, la care se adaugă genele reglatoare.

Regiunea gag codifică *antigenul specific de grup*. ARNm transcris din toată secvenţa *gag*, este tradus ulterior într-o poliproteină precursoare (p55), supusă unui proces de clivare în 3–5 proteine capsidale. Proteinele codificate constant de secvenţa *gag* sunt: *proteina MA (matriceală- p17 necesită legarea cu acidul miristoic pentru legarea strânsă de înveliş)*, proteina de *înmugurire* (p6) din alcătuirea învelişului viral, *proteina CA (capsidală- p24,* componenta structurală majoră a virionului, indicatorul clinic pentru măsurarea antigenemiei) şi *proteina NC* (p7) asociată ARN genomic.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Regiunea *pro* codifică sinteza *proteazei*, care clivează poliproteinele *gag* şi *pol*.

Regiunea pol codifică sinteza a două proteine esenţiale în fazele timpurii ale ciclului infecţios: *revers-transcriptaza (RT)* şi *integraza (IN)*, care catalizează integrarea ADN viral într-un cromosom celular.

Secvenţele *pro* şi *pol* nu sunt gene distincte. Ele sunt transcrise în ARNm al genei *gag*, iar traducerea are loc numai în cazul în care complexul enzimatic al traducerii depăşeşte codonul semnal de terminare a secvenţei gag. Toate proteinele precursoare care conţin proteinele *pro* şi *pol* conţin întreaga proteină *gag*.

Regiunea env codifică o glicoproteină precursoare de înveliş, de 150–160 kDa, clivată în glicoproteina de 120–135 kDa – *SU* (*S*urface) şi *TM* (*T*ransmembrane), de 40–50 kDa. După clivare, cele două proteine rămân asociate prin legături necovalente. Proteina *SU* are rolul de a recunoaşte receptorul celular, iar proteina *TM* ancorează complexul *proteina SU-receptor*, de învelişul viral.

Spre deosebire de celelalte gene, gena *env* este transcrisă dintr-un ARN subgenomic înnădit.

Proteinele enzime ale virionului. Produsul de sinteză a genei *pol* este scindat de proteaza virionică şi rezultă *revers-transcriptaza* (RT) şi *integraza*.

RT, spre deosebire de alte polimeraze virale, este uşor separabilă de componentele virionului. Este un *heterodimer* alcătuit din subunitatea de 66 kDa cu activitate catalitică şi subunitatea 51 kDa. RT are şi activitate RN-azică H, ce degradează matriţa de ARN.

Integraza catalizează inserţia aleatorie a ADN viral în genomul celulei gazdă.

Proteaza este o aspartil-protează homodimerică, catalizează clivările ce separă proteinele *gag* şi *pol* una de cealaltă.

Proteinele de înveliş sunt asemănătoare la toţi membrii familiei, fiind formate din două catene polipeptidice, legate prin punţi S-S:

- *proteina SU* (gp 120) are 5 domenii, legate prin punţi S-S. Domeniul V_3 este epitopul major recunoscut de RCT. Are rolul de a recunoaşte receptorul membranar al celulei sensibile. Anticorpii specifici neutralizează infecţiozitatea virală, dar glicozilarea extensivă împiedică legarea Ac;
- *proteina TM* (gp 41) are trei domenii: citoplasmatic (20–30 de aminoacizi), transmembranar şi extern, asociat cu *proteina SU*. Cele două proteine rezultă prin clivarea proteinei 160, catalizată de o protează a celulei gazdă.

Ciclul de multiplicare

Ciclul multiplicării retravirusurilor are două faze distincte, separate de treapta *integrării*. Evenimentele primei faze sunt catalizate de *enzimele virionului*, iar cele ale fazei a II-a, de *enzimele celulare*.

Virionii se ataşează de moleculele *receptor* ale celulei sensibile prin intermediul *proteinei SU*. Învelişul viral şi membrana *fuzionează*, astfel încât nucleocapsida virionului este eliberată în citoplasmă.

În interiorul *nucleocapsidei* parţial dezvelită, are loc *transcrierea inversă** a ARN genomic, în ADN dublu catenar, proces catalizat de RT virală. *ADN este intermediarul de replicare* şi transcriere a genomului retraviral. Concluzia existenţei intermediarului ADN a fost emisă de H. Temin şi D. Baltimore (1970), pe baza rezultatelor experimentale cu privire la sensibilitatea replicării acestor virusuri la *actinomicina D*. Antibioticul interferă cu procesul de transcriere ADN-ARN, deoarece se leagă cu mare afinitate de ADN şi stopează funcţia ARN-polimerazei. În celulele infectate cu ribovirusuri obişnuite, actinomicina D blochează sinteza ARN celular, dar nu modifică sinteza ARN viral. În celulele infectate cu retravirusuri, actinomicina D inhibă complet sinteza ARN (celular şi viral) şi, în consecinţă, inhibă multiplicarea virală, ceea ce reflectă dependenţa replicării şi transcrierii ARN de un intermediar ADN.

* Fiecare virion conţine una sau mai multe molecule de RT. Activitatea catalitică a RT s-a evidenţiat după permeabilizarea virionilor cu detergent neionic şi incubare în tampon cu dezoxinucleotid-trifosfaţi, unul fiind marcat radioactiv. Se sintetizează ADN complementar (ADNc), dar reacţia este blocată în prezenţa actinomicinei D.

Revers-transcriptaza este *multifuncţională*:

- un domeniu al enzimei catalizează sinteza unei catene de ADN cu polaritate negativă, complementară faţă de catena ARN a genomică, pe care o utilizează ca matriţă. RT este o

ADN-polimerază dependentă de ARN. Enzima utilizează ca matriță nu numai o moleculă de ARN, ci și o catenă de ADN: utilizează ca matriță, catena de ADN de polaritate negativă și catalizează sinteza catenei de polaritate pozitivă (fig. 435);

– un alt domeniu are acțiune *RN-azică* (RN-aza H; H = Hibrid) și degradează catena ARN din hibridul ARN-ADN. RT acționează atât ca endonuclează, cât și ca exonuclează și produce *grupări 3'OH și 5'P*, lăsând un oligoribonucleotid ca primer pentru sinteza celei de a II-a catene de ADN. Grupările 3'OH generate de RN-aza H sunt substratul acțiunii ADN-pol.

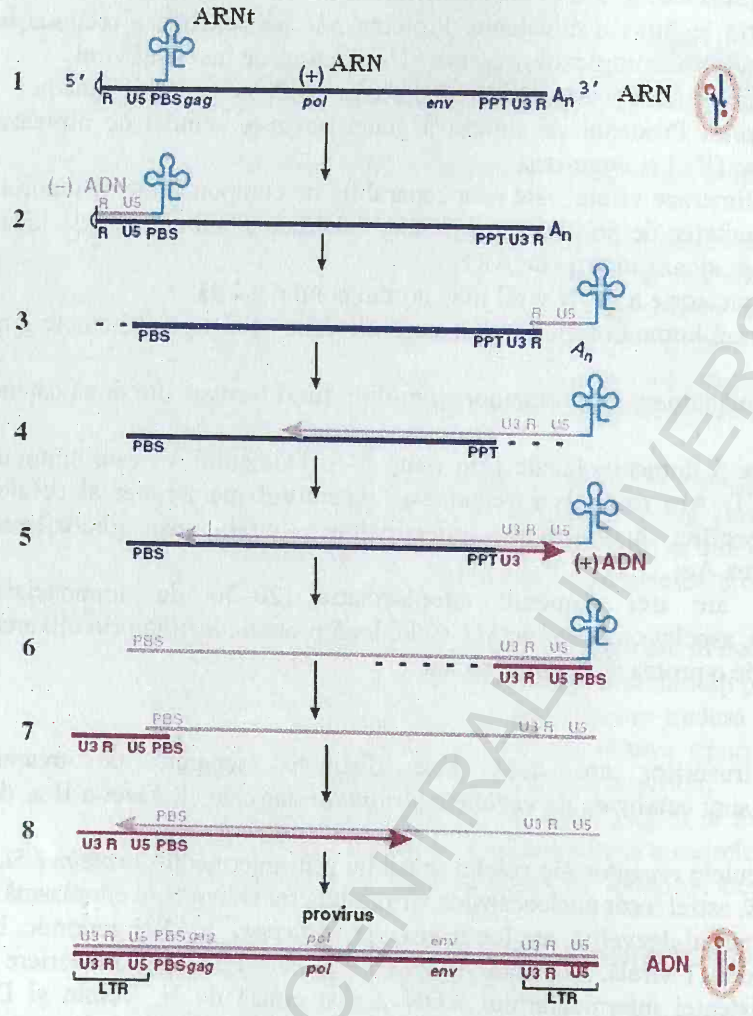


Fig. 435. Ilustrarea schematică a mecanismului revers-transcrierii. RT utilizează ca primer ARNt de origine celulară și sintetizează o secvență scurtă de ADN la capătul 5' al matriței, după care complexul molecular de transcriere format din RT, factorii celulari de transcriere și secvența scurtă de ADN, sare la capătul opus (3') al matriței și apoi progresează până la terminarea sintezei primei catene de ADN. Catena de ADN are rol de matriță pentru sinteza celei de a II-a catene. Cele două catene de ADN sunt mai lungi decât matrița, prin copierea dublă a secvențelor repetate direct de la capetele matriței (U_3 și respectiv U_5). Secvențele duble constituie LTR. PBS = situsul de legare a polimerazei (după *John B. Carter* and *Venetia A. Saunders*, 2007).

Activitatea RT este dependentă de un ARN primer. Rolul de *primer* îl are ARNt asociat genomului viral, iar pentru sinteza catenei de polaritate pozitivă rolul de primer revine catenei de ARN genomic clivată la nivelul secvenței PP (A,G), sub acțiunea RN-azei H.

Copia de ADN dc este mai lungă decât matrița de ARN, datorită duplicării secvențelor repetate direct de la fiecare capăt și rezultă LTR. Fiecare LTR conține secvențe unice derivate de la ambele capete ale genomului (U_3 și U_5), care încadrează un element repetat – R – în structura U_3-R-U_5.

Sinteza ADN pare a avea loc în interiorul nucleocapsidei, în citoplasmă, în primele 4–8 ore după infecție. Produsul sintezei este o *moleculă de ADN dc lineară*. În această conformație, molecula este transportată în *nucleu*.

Capetele ei sunt reunite sub acțiunea unei *ligaze* de origine celulară. Se formează astfel, o moleculă de *ADN, circulară, închisă covalent.*

Integrarea. Provirusul asociat cu unele proteine virale este transportat spre nucleu ca un complex de preintegrare. Cele mai multe retravirusuri se integrează numai când celula intră în mitoză.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cursul mitozei, membrana se dezintegrează şi favorizează integrarea. Infecţia productivă ar avea loc numai în celulele care se divid. Dar, HIV şi alte retravirusuri pot infecta celulele în repaus, deoarece complexul preintegrării intră în nucleu.

Integrarea genomului viral, în ADN celular este un proces unic, deoarece se integrează sub forma ADN dc, linear. Integraza asociată genomului viral taie cele cele două catene ale ADN viral, la secvenţe specifice, dar şi catenele de ADN cromosomal celular şi probabil menţine capetele ADN linear în proximitate strânsă. Integraza produce clivări succesive la capetele LTR şi în ADN celular. Ligazele celulare leagă şi repară capetele celor două molecule de ADN. ADN viral integrat devine *provirus* şi fiecare LTR este mai scurt cu două perechi de baze.

Integrarea are o specificitate înaltă, adică totdeauna aceleaşi secvenţe ale ADN viral se găsesc în asociaţie cu ADN celular. Din punctul de vedere al situsului cromosomal, integrarea este mai puţin specifică. Există tendinţa ca integrarea să aibă loc la *situsuri cromosomale transcrise activ*, a căror *structură cromatică este laxă.*

Provirusul integrat poate fi exprimat imediat sau nu este transcris şi infecţia evoluează latent. Dacă celula infectată latent se divide, provirusul este copiat odată cu genomul celulei şi fiecare celulă fiică primeşte o copie a provirusului.

Integrarea genelor virale poate produce mutaţii prin inserţie, ce pot activa oncogenele, pot inactiva GST (genele supresoare ale tumorilor) sau determină un efect letal.

Transcrierea şi replicarea genomului

Cele două LTR ale provirusului au secvenţe identice, dar diferă funcţional. Transcrierea este iniţiată la un capăt al secvenţei codificatoare şi se termină la celălalt. LTR 5' are activitate de promotor, adică are situsuri de legare (TATA box) pentru iniţierea şi reglarea transcrierii. Toate retravirusurile studiate au TATA box în domeniul U_3. ARN-pol II a celulei începe transcrierea la joncţiunea U_3-R. Procesul se termină la joncţiunea R-U_5. Copiile sunt bonetate şi poli-adenilate. Unele copii vor funcţiona ca mesageri, iar o parte dintre ele se înnădesc. Alte copii ale ADN proviral devin genomuri ale virionilor progeni.

Transcrierea ADN proviral este reglată de secvenţa *enhancer* (stimulatoare) cu acţiune *cis*, ce amplifică promotorii virali şi celulari. Elementele enhancer sunt active numai în anumite ţesuturi şi celule sau numai în anumite stadii ale ciclului celular sau numai la anumite specii. Existenţa sau absenţa elementelor *enhancer* explică tropismul viral pentru anumite celule, independent de receptorii membranari.

Retravirusurile sunt sisteme genetice care au o înaltă capacitate de a schimba informaţie genetică cu celula gazdă. Sunt singurele care dobândesc gene celulare şi le convertesc la *oncogene*.

Integrarea ADN proviral este stabilă, *ireversibilă*. Nu există mecanisme de excizie, de replicare independentă de cromosom, sau de translocaţie de la un situs la altul.

Replicarea genomului viral integrat se face prin mecanismul *transcrierii ADN proviral*, în ARN.

Transcrierea[*] este catalizată de ARN-polimeraza II celulară. În celulele Ek, transcrierea începe la un situs specific şi se termină la o secvenţă în aval de genă. Iniţierea şi terminarea transcrierii definesc limitele unităţii funcţionale – gena. Terminarea transcrierii este cuplată cu prelucrarea: clivarea şi poliadenilarea capătului 3'.

[*] Cea mai mare parte a ADN la Ek este organizată sub forma nucleosomilor, care constau din 165 pb, înfăşurate de 2 ori în jurul unui octamer histonic, alcătuit din 2 dimeri H_2A-H_2B şi un tetramer alcătuit din 2 H_3 şi 2 H_4. În această conformaţie, ADN este inaccesibil transcrierii. H_1, asociată nucleosomului, este un inhibitor puternic al transcrierii. În ADN transcris activ (promotor şi enhancer), nucleosomii sunt dislocaţi, iar spirele ADN rămân expuse şi uşor accesibile transcrierii.

În timpul transcrierii, este necesar ca ARN-pol să se rotească pe matriţa de ADN, sau ca altă proteină să acţioneze pentru atenuarea tensiunii de supraspiralizare. Topoizomeraza I este implicată în despiralizarea ADN pentru transcriere.

În general, unităţile de transcriere sunt mai lungi decât necesarul de codificare a unei proteine. Provirusul ADN funcţionează ca o singură unitate cistronică şi este transcris într-o singură moleculă de ARN. Prelucrarea[*] ulterioară a copiilor în *ARN genomic sau în ARNm* este catalizată de enzimele celulare.

[*] Toate moleculele de ARNm la eucariote, cu excepţia ARNm al histonelor, au secvenţa poli-A, adăugată post-transcriere la capătul 3', sub acţiunea unei enzime multimere. Poli-A (200–300 nucleotide) de la capătul 3' al ARNm, probabil conferă stabilitate, uşurează translocaţia nucleo-citoplasmatică şi condiţionează chiar traducerea. Secvenţa poli-A este prezentă la 85–88% dintre moleculele de ARNm la vertebrate. La 12–15% se găseşte o altă secvenţă: AUUAAA sau AUAAA. Prezenţa U în poziţia a 3-a este esenţială pentru clivajul endonucleolitic al ARNm.

B.C.U. „N. EMINESCU" IAŞI BIOLOGIE

O parte dintre copiile de ARN sunt prelucrate în nucleu prin *bonetare şi poliadenilare* şi rezultă ARN genomic. Restul copiilor sunt *clivate şi înnădite* şi vor genera ARNm pentru sinteza proteinelor virale (*gag, gag-pro-pol, env*) în diferite combinaţii cantitative.

Traducerea. Proteinele *gag, pro, pol* sunt sintetizate de polisomii liberi, iar glicoproteina *env*, pe poliribosomii asociaţi reticulului endoplasmic.

Proteina *env* este sintetizată cu o secvenţă leader, clivată în cisternele reticulului endoplasmic. Glicozilarea şi clivarea în unităţile SU şi TM se fac în cisternele golgiene, sub acţiunea enzimelor celulare. În absenţa clivajului, virionii nu sunt infecţioşi. Cele două proteine se inseră pe faţa externă a membranei citoplasmatice.

Asamblarea şi înmugurirea sunt procese simultane la majoritatea retravirusurilor şi sunt asociate cu membrana citoplasmatică.

Proteinele regiunii centrale a virionului (*NC, RT, IN, PR*) se asociază cu ARN genomic şi formează nucleocapsida, care la rândul ei recunoaşte specific proteina *env* (*SU* şi *TM*) inserată în membrana şi concomitent are loc *înmugurirea.*

Multiplicarea virusurilor oncogene nu interferă cu procesele vitale ale celulei. Celulele infectate nu mor. Ele sunt transformate malign, se divid şi concomitent produc virus progen. Este o *transformare productivă.*

Proprietăţile noi dobândite după infecţia cu retravirusuri (starea malignă şi producerea de virus), se transmit generaţiilor succesive de celule prin intermediul provirusului. Integrarea ADN viral este baza genetică a permanenţei infecţiei cu retravirusuri.

Retravirusurile infecţioase pentru om sunt:

- HIV-1 şi HIV-2;
- HTLV 1 şi 2 (produc leucemia celulelor T la adult şi tulburări neurologice);
- spumavirusul primatelor detectat în carcinomul nazofaringian cultivat;
- virusurile endogene (HERV). Se comportă ca secvenţe mendeliene în cromsomii umani şi reprezintă infecţii 'fosile" ale celulelor germinative. Sunt virusuri defective, deoarece nu au fost izolate în formă infecţioasă, spre deosebire de PERV (virusuri endogene ale porcinelor).

Subfamilia Lentivirinae

Virusurile acestei familii produc infecţii cu o perioadă lungă de incubaţie, persistă în competiţia cu efectorii RI, infectează mai multe organe, iar infecţiile au o evoluţie lentă, dar fatală.

Pe baza tropismului faţă de celule, lentivirusurile pot fi împărţite în două grupe :

- virusuri care se multiplică predominant în *macrofage*: virusul anemiei infecţioase a equinelor (EIAV), lentivirusurile ovinelor (virusurile pneumoniei progresive şi virusul maedi-visna); lentivirusurile caprinelor (virusul artritei-encefalitei);
- virusuri care se multiplică în *limfocite şi macrofage*: HIV, SIV, FIV.

Toate au acelaşi set de gene structurale (*gag, pol, env*) ce codifică proteinele regiunii centrale, RT şi glicoproteinele de înveliş. Genele reglatoare (*tat, rev, vif, vpu, vpr, nef*) controlează transcrierea genelor, transportul ARN şi traducerea. Ele au omologie limitată la diferite lentivirusuri, dar funcţiile sunt aceleaşi. Probabil, ele au fost transduse din genomul gazdei şi favorizează persistenţa şi patogeneza.

Istoric. Anemia cronică recurentă a calului este recunoscută în Europa din 1843, iar agentul inductor a fost primul virus identificat (1904) infecţios pentru animale (EIAV), dar pentru că n-a fost cultivat *in vitro*, studiul biologiei moleculare a întârziat. EIAV este transmis de tabanide, dar nu se multiplică în artropodul vector.

Pneumonia progresivă a ovinelor produsă de un lentivirus a fost descrisă în Africa de sud (1915), iar în 1930 s-a recunoscut o nouă formă de *pneumonie cronică* în Islanda (*maedi*). În deceniul următor s-a descris o nouă maladie neurologică, caracterizată prin paralizie şi epuizare (*visna*), numai la turmele care aveau maladia pulmonară maedi. Maladia visna-maedi a apărut în Islanda numai după importul a 20 de berbeci karakul.

Infecţia caprinelor cu lentivirusuri s-a descris în 1974, la iezii de 1–4 luni. Virusul produce artrită şi leucoencefalomielită. Ulterior s-a descoperit BIV, HIV-1 şi HIV-2.

Primul retravirus infecţios pentru organismul uman, a fost izolat de R. Gallo (1980) şi la denumit *HTLV* (*H*uman *T L*ymphotropic *V*irus), datorită tropismului său pentru limfocitele T mature, agentul cauzator al leucemiei celulelor T. Celulele maligne nu produc virus, astfel că blocarea multiplicării virale nu are semnificaţie terapeutică. S-au identificat două variante serologice ale virusului leucemiei limfocitelor T: HTLV I şi HTLV II.

Ulterior s-au descoperit lentivirusurile infecţioase pentru maimuţe (macaccus, mandril, maimuţă verde africană, cimpanzeu). La gazdele naturale, lentivirusurile maimuţelor sunt relativ nepatogene, dar transferul lor la specii care nu sunt purtătoare de virus, produce îmbolnăvirea. Aşa s-a întâmplat cu visna-maedi în Islanda, după aducerea oilor karakul şi cu HIV în Africa. *FIV* este ultimul lentivirus identificat, producător de imunodeficienţă.

HTLV I produce leucemia celulelor T la adult (ATL) şi limfomul, precum şi dezordinea SNC, parapareza spastică tropicală. La indivizii infectaţi (10–20 milioane pe tot globul), virusul este produs la un titru foarte scăzut. Se transmite de la mamă la făt prin secreţia lactată, prin sângele transfuzat, prin celulele infectate. În zonele endemice, peste 10% din populaţie este seropozitivă.

HTLV II s-a izolat, dar nu a fost asociat cu nici-o maladie specifică. HTLV I şi II au omologie de 65% a secvenţei de nucleotide.

Virusurile limfotrope au afinitate marcată pentru celulele T mature.

HIV. Virionul are diametrul de 100 nm, cu 72 de spicule derivate din gp120, ancorate în membrană prin gp41 (TM). HIV are un tropism foarte bine exprimat pentru limfocitele Th şi din acest motiv R. Gallo (1982) l-a denumit *HTLV III*, pentru a-l deosebi de cele 2 variante serologice HTLV I şi II. Denumirea de HIV a fost dată de ICNV. HIV şi HTLV au tropism marcat pentru limfocitele TCD_4 şi produc infecţii cu evoluţie lentă.

S-au identificat două variante serologice (subtipuri) de HIV, 1 şi 2. HIV 1 este mai agresiv şi produce imunodeficienţe severe, iar HIV 2 produce infecţii cu efecte patologice mai atenuate în sfera imunitară şi este predominant în Africa de Vest. În funcţie de specificitatea lor antigenică, există mai multe linii de HIV, toate aparţinând lui HIV 1 şi HIV 2. Se pare că există linii de HIV care nu produc manifestări clinice.

HIV 1 pare să aibă originea în SIV infecţios pentru cimpanzeu (*Pan troglodytes*), iar HIV 2 ar proveni din SIV care infectează *Cercocebus atys*. Cimpanzeii infectaţi cu HIV 1 sau cu SIV_{cpz} nu fac maladie SIDA, deşi omul şi cimpanzeul au asemănare a genelor în proporţie de 98%. Se crede că SIV_{cpz} a infectat gazda cu circa 10 000 de ani în urmă, timp în care interacţiunea a evoluat prin selecţia unor tulpini virale care nu omoară gazda. SIV_{cpz} a trecut la gazda umană, devenind HIV 1, recent, când omul a distrus jungla africană, mediul de viaţă al cimpanzeului. Probele de sânge recoltate şi îngheţate în 1959 şi analizate după descoperirea virusului au fost pozitive pentru Ac anti-HIV. HIV a evoluat din SIV_{cpz} la începutul anilor '50, un interval scurt care n-a permis selecţia unor tulpini mai puţin patogene.

Organizare genetică

Lentivirusurile au o organizare genetică mai complexă decât celelalte retravirusuri, deoarece pe lângă cele 3 gene (*gag, pol, env*), au câteva gene mici, suplimentare, reglatoare, localizate între genele *pol* şi *env* (fig. 436).

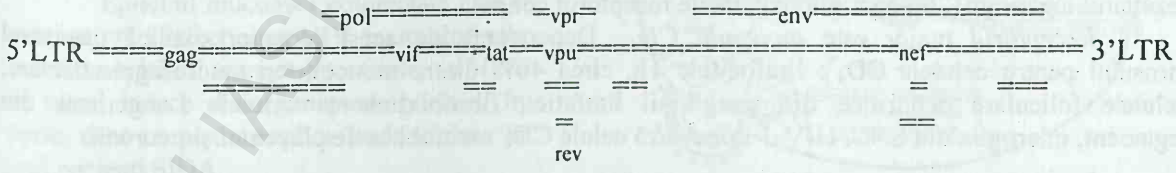


Fig. 436. Organizarea genomului HIV.

Genele reglatoare sunt transcrise timpuriu în ciclul de multiplicare, reglează cantitatea de ARN genomic şi de ARNm, precum şi transportul spre citoplasmă pentru a fi tradus. Aceste procese sunt influenţate de starea fiziologică a celulei. De exemplu, celulele TCD_4 neangajate sunt infectate neproductiv de către HIV-1.

HIV-1 are cel puţin 8 gene reglatoare şi accesorii: *vif* (virion infectivity factor), *vpu, vpr, tat, rev* (reglator al expresiei proteinelor virale), *nef* (negative reglatory factor, cu rol reglator al transcrierii şi al stadiilor finale ale multiplicării).

Genele sunt suprapuse, adică sunt localizate pe acelaşi segment al moleculei de ARN genomic.

Proteine reglatoare. Tat (transactivation gene) codifică un peptid de 14 kDa ce stimulează de 1000 de ori transcrierea genelor virale. Proteina este predominant citoplasmatică, dar poate fi eliberată din celulele infectate şi pătrunde în celulele adiacente, deoarece are un domeniu bogat în Arg, ceea ce îi permite să se lege eficient de membrană.

Gena *rev* (reglatoare a expresiei proteinelor virale), favorizează transferul copiilor de ARNm din nucleu în citoplasmă, unde sunt traduse, deoarece ARNm virali pentru proteinele structurale, enzimatice şi accesorii, au secvenţe care favorizează retenţia nucleară (T. Mak, 2006). *Rev* contracarează aceste secvenţe şi uşurează exportul ARNm virali în citoplasmă, fiind esenţială pentru sinteza proteinelor virale. În absenţa *rev*, ARNm viral este degradat. Are rolul de a schimba infecţia latentă a monocitelor, într-o infecţie productivă.

Proteine accesorii. Gena *nef* (negative factor gene) codifică un peptid de 27 kDa. *In vivo* este necesară pentru multiplicarea eficientă, deoarece se leagă fizic de moleculele CMH I, CMH II şi CD_4 pe suprafaţa celulei. Conectarea induce internalizarea moleculelor de suprafaţă în vezicule tapetate cu clatrină, urmată de degradarea lizosomală. Proteina *Nef* diminuează expresia HLA-A, HLA-B (dar nu HLA-C) şi CD_4 pe suprafaţa celulelor infectate, uşurând expresia proteinei *Env*, fară interacţiunea cu CD_4.

Proteina *Vif* (viral infectivity factor) este structurală şi are rol stabilizator al ADN viral nou sintetizat. Se asociază cu proteinele citoscheletului, uşurând transportul ADN viral în nucleu. *Vif* este exprimată la nivele înalte în citoplasma celulelor infectate şi măreşte eficienţa infecţiei HIV *in vitro*.

Vpr (viral protein *r*, 15 kDa) este necesară pentru infecţia productivă, deoarece orientează ADN viral spre nucleul celulei, împreună cu proteinele nucleare (importina α şi o nucleoporină); opreşte celulele în faza G_2 a ciclului mitotic, stimulând producerea virusului progen.

Vpu (viral protein *u*, 16 kDa), este necesară pentru infecţia HIV productivă. Vpu se asociază cu noile molecule CD_4 sintetizate şi le orientează spre degradarea proteasomală, diminuând expresia lor membranară. Interferă cu biosinteza moleculelor CMH I, blocând expresia lor pe suprafaţa membranei.

În gena *pol* (între RN-aza H şi integrază), la lentivirusurile neprimatelor (FIV, EIAV, visna, CaEV) s-a identificat un segment genic ce codifică o *dUTP-ază*, o proteină structurală, a cărei funcţie este de a împiedica încorporarea U în ADN. Gena este necesară pentru multiplicarea virusurilor în macrofage, celule diferenţiate terminal ce nu se divid şi au nivele scăzute de dUTP-ază.

Ciclul de multiplicare

Lentivirusurile au o relativă specificitate de specie, ceea ce a împiedicat crearea unui model animal pentru infecţia cu HIV-1. Se multiplică (fig. 434) în *celule diferenţiate terminal,* care nu se divid: monocitele şi limfocitele din ganglionii limfatici, splină, măduvă osoasă, care constituie rezervorul primar.

Din rezervorul primar, monocitele şi limfocitele se diseminează în toate organele: creier, plămân, articulaţii şi în alte organe în care monocitele se maturează în macrofage, iar limfocitele se activează. În ciclul de multiplicare a retraviridelor se succed fazele timpurii şi tardive. Ataşarea este rezultatul legării gp120 bogat glicozilată, de receptorul celulei.

Receptorul major este *molecula* CD_4*. Dependenţa de acest receptor explică tropismul virusului pentru celulele CD_4^+: limfocitele Th, circa 40% dintre monocite şi macrofagele tisulare, celulele foliculare dendritice din ganglionii limfatici, fibroblastele şi celulele Langerhans din tegument, microglia din SNC. HIV-1 infectează celule CD_4^-: trofoblastele placentei şi neuronii.

* Afinitatea virusului pentru receptorul celular CD_4 este foarte înaltă: de exemplu, moleculele solubile de CD_4 pot să inhibe competitiv infecţia cu HIV. Blocarea multiplicării virale este importantă pentru că SIDA se corelează cu titru viral crescut. CD_4 în formă solubilă este un potenţial inhibitor al multiplicării HIV.

Gp120 se leagă de domeniul al II-lea al moleculei CD_4. Receptorul CD_4 leagă cu afinitate înaltă gp120, dar nu şi suficientă pentru infecţia celulei cu HIV: pentru fuziunea învelişului viral cu membrana citoplasmatică sunt necesari co-receptorii. Co-receptorii sunt receptori pentru *chemokine*,

ceea ce explică tropismul înalt al virusului pentru limfocite şi macrofage. Pentru edificarea RI, co-receptorii leagă chemokinele şi controlează traficul leucocitelor şi diferenţierea celulelor T. Cele mai multe chemokine aparţin uneia dintre cele 2 clase, în funcţie de aranjamentul resturilor de Cis la capătul N-terminal: -C- C- şi – C-X-C (C=cisteină; X=alt aminoacid). Receptorii de chemokine sunt desemnaţi cu acronimele CCR şi respectiv CXCR.

Tulpinile de HIV inductoare ale sincitiilor se fixează pe receptori celulari care se deosebesc de receptorii pentru tulpinile nesincitiale.

Al II-lea receptor pentru HIV-1 este CD_{26}, o moleculă esenţială pentru infecţia macrofagelor.

Peplosul viral fuzionează cu membrana plasmatică a celulei şi eliberează nucleocapsida. În nucleocapsida parţial deschisă, are loc reverstranscrierea ARN genomic într-o moleculă de ADN dublu catenar. Nucleocapsida este transportată prin sistemul microtubulilor până la porii membranei nucleare şi eliberează molecula de ADN viral asociată cu câteva tipuri de proteine.

Revers-transcriptaza şi ARN viral diploid formează un complex nucleoproteic. Copiile de ADN dc se identifică la două ore după infecţie. Perioada de pre-integrare durează *ore*, până la *câteva zile*. În absenţa unui semnal de activare, ADN viral* neintegrat îşi pierde capacitatea de a iniţia infecţia productivă.

* De exemplu, în celulele TCD_4, revers-transcrierea genomului HIV-1 în ADN este incompletă şi ciclul de multiplicare este stopat. După stimularea antigenică a limfocitelor CD_4, ADN viral este translocat în nucleu şi este integrat în ADN celular.

În faza târzie a ciclului, ADN viral este integrat la situsuri aleatorii în ADN celular, este transcris de ARN-pol II a celulei, asociată cu factori celulari. Sunt transcrise molecule lungi, neclivate, de ARN viitoare molecule genomice şi molecule scurte, care vor fi traduse în proteine virale.

Proteinele virale sunt prelucrate proteolitic post-traducere, de proteaze virale sau/celulare.

Iniţierea transcrierii ADN viral integrat implică elemente cis-activatoare, localizate în LTR. În faza timpurie transcrierea ARN se face cu o rată foarte scăzută ; sunt transcrise genele ce codifică proteinele reglatoare Tat şi Rev.

HIV se multiplică în celulele care activează expresia genelor virale: macrofagele diferenţiate şi limfocitele TCD_4 activate. Rezultatul multiplicării este liza. Frecvent, HIV infectează neproductiv (latent) celulele sensibile, dar nu le transformă.

Epiteliul mucoasei colorectale este o cale majoră a infecţiei cu HIV *in situ*. Infecţia celulelor epiteliului ansei intestinale, cu HIV, *in vitro*, induce dezorganizarea bordurii în perie, ceea ce poate explica malabsorbţia la unii pacienţi SIDA.

HIV poate fi izolat din *lichidul sinovial* al pacienţilor cu dureri articulare severe. Faptul sugerează că infecţia *celulelor sinoviale* sau a condrocitelor de către HIV poate contribui la simptomele reumatologice la unii pacienţi SIDA.

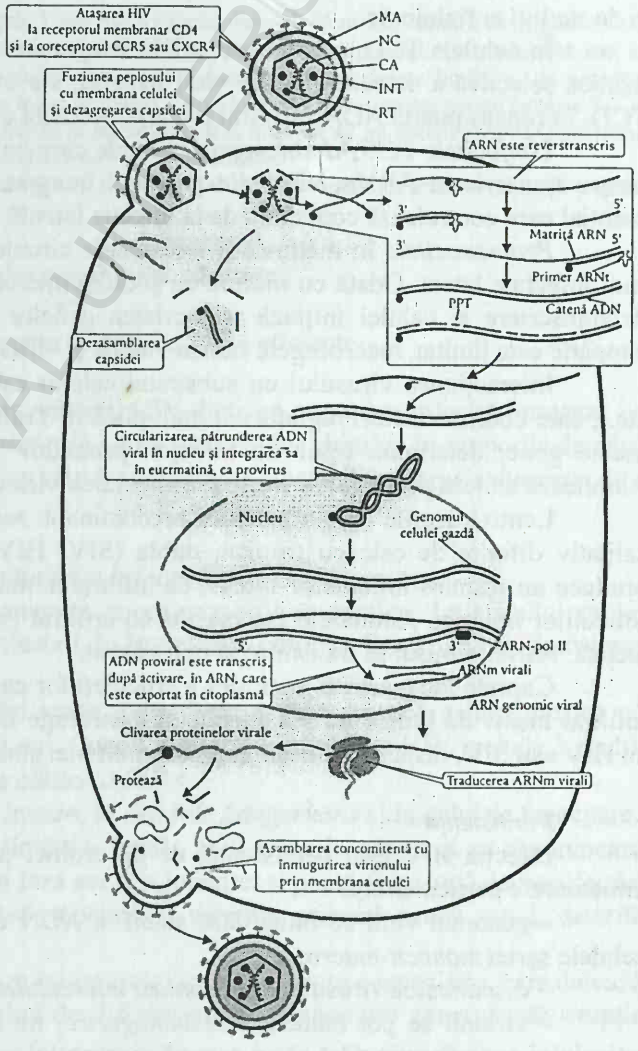


Fig. 437. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a HIV. Amănunte în text.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Utilizarea AMC specifici față de diferite componente membranare a dus la identificarea sfingolipidului *galactozil-ceramid* (GalC), ca un posibil receptor pentru HIV pe celulele neuronale. AMC anti-GalC inhibă infecția, *in vitro*, a celulelor neuronale și a celulelor epiteliale ale colonului uman, cu HIV. Concluzia este că celulele nervoase și ale epiteliului intestinal au o cale comună prin care HIV le infectează.

HIV, legat cu *Ac specifici*, poate infecta eficient macrofagele, limfocitele și alte celule care au receptorul pentru Fc. Virionii tapetați cu Ig (*Ac enhancing*) sunt mai ușor înglobați de celulele cu receptori pentru Fc.

Celulele neuronale și tisulare nu au receptori pentru HIV, dar pot fi infectate indirect, datorită tendinței limfocitelor și macrofagelor infectate de *a fuziona* cu alte celule.

Limfocitele B sunt foarte sensibile dacă au fost infectate cu virusul Epstein-Barr. Virusul pătrunde în celulă și pe calea altor receptori: receptorul pentru Fc și receptorul pentru C_3.

Dovada directă a interacțiunii HIV cu receptorul CD_4 a fost adusă exprimental: transfecția fibroblastelor umane cu gena codificatoare a glicoproteinei CD_4, le-a conferit sensibilitate la infecția cu HIV. Expresia receptorului specific nu este suficientă pentru desfășurarea ciclului de multiplicare în celulele în care s-a clonat gena pentru CD_4, dacă lipsesc alți factori celulari.

Macrofagele infectate nu sunt lizate, dar funcțiile sunt alterate și au rol de *rezervor de virus*. Genomul este organizat și funcționează după mecanismele comune tuturor retravirusurilor.

Infecția cu HIV este *cronică și productivă* ori *latentă*, în funcție nu numai de tipul de celulă, ci și de stadiul ei fiziologic.

În celulele TCD_4 neangajate, ADN integrat nu este transcris și infecția este latentă. Folosind tehnica selectivă a detectării ADN viral integrat, s-a evidențiat că mai puțin de 0,1% dintre celulele TCD_4 în repaus poartă ADN proviral integrat. Aceasta corespunde latenței postintegrare.

Limfocitele TCD_4 de memorie sau cele care se activează după infecția virală, sunt permisive pentru transcrierea ARNm viral din genomul integrat. Activarea limfocitelor pare a fi mecanismul esențial care controlează conversia de la infecția latentă la cea cronică productivă.

Promonocitele în măduvă și *monocitele* circulante, cu valori normale după infecția cu HIV, sunt infectate latent. Odată cu maturarea și diferențierea macrofagului în țesuturi sau *in vitro*, factorii de transcriere ai celulei inițiază transcrierea genelor virale și infecția devine productivă. Efectul citopatic este limitat, macrofagele rămân viabile și virusul se multiplică intens.

Interacțiunea virusului cu substratul celular este modulată de genele HIV (*tat, rev, nef, vpr* etc.), care codifică factori reglatori ai multiplicării. Transcrierea predominantă a uneia sau alteia dintre aceste gene, determină tipul de infecție: *productiv* sau *latent*. Sinteza crescută a proteinei *Tat* stimulează sinteza proteinelor virale și asamblarea virionilor progeni.

Lentivirusurile ce infectează predominant *macrofagele* (la ovine, caprine) induc leziuni calitativ diferite de cele cu tropism dublu (SIV, HIV). La oaie și capră, în organele infectate se produce un răspuns inflamator intens, cu infiltrarea macrofagelor și limfocitelor și chiar cu formarea foliculilor limfoizi. Animalele fac mastită cu infiltrat limfocitar și cu macrofage, care trece în secreția lactată. Astfel, virusul se transmite la nou-născut.

Caprele fac o artrită, mai ales a articulațiilor carpiene, cu hiperplazia membranei sinoviale, cu infiltrat masiv de limfocite, plasmocite și macrofage în țesutul subsinovial. La organismele infectate cu HIV sau SIV, răspunsul inflamator este mult mai slab.

Persistența

Infecția HIV este persistentă, de tip cronic, productivă, sau latentă și este condiționată de următoarele particularități:

– genomul viral se integrează stabil în ADN celular, ca *provirus*, în limfocitele TCD_4 și în celulele seriei *monocit-macrofag*;

– diseminarea virusului prin *contact intercelular*, astfel încât este inaccesibil anticorpilor;

– virionii se pot matura prin *înmugurire*, nu numai la suprafața celulei, ci și în cisternele reticulului endoplasmic, fără să se expună contactului cu efectorii răspunsului imun;

– *variația genetică a virionilor și variația antigenică* a glicoproteinelor de înveliș. În cea mai variabilă regiune a genomului (gena *env*), variațiile genomice individuale au rata de 1 mutație la 1000–

10.000 nt/ciclu de replicare, datorită absenței funcției de "corectare" (proof-reading) a RT. În cursul transcrierii catenei ARN în ADN de polaritate negativă, la un genom de 10.000 nucleotide, RT introduce cel puțin o mutație punctiformă (încorporarea greșită a unei baze). În afară de mutații punctiforme, genomul HIV realizează procese de recombinare, deoarece împachetează două copii de ARN genomic. Dacă se produce co-infecția celulei și co-împachetarea moleculelor distincte de ARN, RT poate schimba matrița de ARN în timpul sintezei ADN, ceea ce creează inserții și deleții, care introduc schimbări antigenice într-un singur ciclu de multiplicare. Co-infecția este greu de demonstrat *in vivo*, dar numărul crescând de forme recombinate circulante sugerează că evenimentul se produce cu o frecvență relativ crescută. Recombinanții sunt analogii reasortanților virusului influenza A. În absența vaccinului, numărul recombinanților va crește progresiv, iar transmiterea virusului va fi favorizată. Odată cu diversificarea genetică a virusului, găsirea tratamentului și a vaccinului va fi tot mai dificilă.

Substituțiile de baze în gena *env*, ca rezultat al ratei înalte de mutație se acumulează cu o rată de circa 1%/an. Pentru comparație, la dezoxiribovirusuri rata mutației este de 1 mutație la 10^8 nt/ciclu de replicare.

Glicoproteinele de înveliș (gp120 și gp41) ale diferitelor izolate de virus, chiar de la același pacient, pot să prezinte variație a 10–16% din totalul aminoacizilor

Acumularea mutațiilor dincolo de un prag critic determină apariția unor noi variante antigenice*, care nu dau reacție încrucișată, ceea ce face ca RI să fie ineficient.

* Majoritatea izolatelor HIV infectează limfocitele T sau macrofagele, dar s-au identificat tulpini cu tropism diferit pentru linii de macrofage și celule mieloide (N, B, E). Izolatele HIV de la indivizii asimptomatici se multiplică lent în celulele mononucleare stimulate cu PHA, nu formează sincitii și nu pot fi pasate în linii celulare limfoide. În contrast, izolatele HIV-1 de la pacienții SIDA se *multiplică repede*, induc formarea *sincițiilor* (Sin) și au tropism pentru celulele T.

S-a presupus că mutantele Sin sunt eliminate eficient în stadiul inițial al infecției de un sistem imunitar funcțional, dar emerg în stadiile tardive ale progresiei SIDA, după deteriorarea funcției imunitare.

Variantele NSin se detectează în tot cursul infecției cu HIV-1, chiar când predomină variantele Sin, cu tropism pentru macrofage și cu rol major în persistența virală.

Noile variante antigenice permit virusului o mai bună adaptare:
– să infecteze noi tipuri celulare;
– să dobândească rezistență la medicamente antivirale foarte eficiente;
– să scape acțiunii efectorilor imunitari.

Din punct de vedere genetic și antigenic, virionii HIV dintr-un organism infectat formează un spectru continuu de particule înrudite, dar diferite prin componentele lor chimice în proporție de până la 7–8%. Consecința directă a variației antigenice este *incapacitatea efectorilor răspunsului imun* de a elimina virusul.

Răspunsul imun anti-HIV și evoluția clinică a infecției.

Infecția cu HIV a atins, cel puțin în anumite zone, proporții epidemice. La sfârșitul anului 2002 erau înregistrați 42 milioane de indivizi infectați. În Bostwana, Lesotho, Swaziland și Zimbabwe, rata infecției variază între 31 și 38,8%.

Infecția cu HIV, inițial, are manifestări acute, urmată de o fază cronică asimptomatică cu multiplicare activă și diseminare, timp de 5–10 ani. Cursul clinic al infecției cu HIV include 3 stadii: *infecția primară, latența clinică* și *manifestarea clinică a SIDA.*

Inițial, virusul se multiplică la locul de intrare, în *celulele Langerhans* și în celulele fagocitare.

De aici se disemineză în ganglionii limfatici locali, apoi trece în sânge și se disemineză sistemic. Aceasta este etapa *viremiei primare* în faza acută a infecției și poate fi însoțită de manifestări clinice acute. Faza viremiei acute durează 2–4 săptămîni. Viremia primară scade rapid, datorită răspunsului imun mediat celular.

Infecția primară declanșează manifestarea simptomelor clinice acute nespecifice, care durează 2–6 săptămâni: dureri de cap și musculare, febră de diferite grade, adenopatie generalizată, erupție eritematoasă maculară fără prurit.

Individul devine viremic. În această fază, HIV infectează CD, macrofagele și limfocitele T CD_4 din lamina propria a epiteliilor. CD și celulele T transportă virusul la ganglionii regionali și îl

prezintă limfocitelor T CD_4 naive. Multiplicarea virală în celulele CD_4^+ progresează cu o rată exponențială. Cantitatea de virus se dublează la fiecare 6–10 ore. Incărcătura virală este de 10^5–10^7 virioni/ml sânge, iar individul are nivel maxim de contagiozitate.

Anticorpii serici neutralizanți IgM anti-HIV sunt detectabili tardiv, la 4–8 săptămâni după infecție (seroconversie). După alte câteva săptămâni se sintetizează IgG. Cele mai imunogene molecule virale sunt proteinele de înveliș (*Env, Gag*), deoarece sunt expuse timpuriu în membrana celulelor infectate.

După seroconversie, titrul Ac anti-HIV rămâne scăzut, comparativ cu titrul Ac față de alți patogeni. Testul ELISA pentru detectarea Ac specifici poate să ofere un rezultat fals negativ. Diagnosticarea rapidă a infecției cu HIV, se face folosind tehnica PCR pentru detectarea ADN proviral sau metoda ELISA pentru detectarea proteinelor HIV.

Imunitatea mediată celular anti-HIV se detectează foarte timpuriu după infecție (în cea de a II-a săptămână) și este dominată de numărul mare de limfocite TCD_8, al căror număr crește de 10–20 de ori față de valorile normale (200–600/μl). Raportul limfocitelor CD_4/CD_8 (valoarea normală este 2/1) se inversează. Limfocitele TCD_8 lizează specific celulele infectate cu HIV, care expun proteinele *env* (SU și TM) la nivelul membranei.

Limfocitele TCD_8 diminuează viremia primară, atât prin efect citotoxic direct asupra limfocitelor T CD_4 infectate, cât și prin efect represor indirect, mediat de *citokine*. În stadiul timpuriu al infecției, crește nivelul TNF, IL-1, IL-2, IL-6 și IFN γ.

Celulele NK au rolul de a liza celulele țintă prin mecanismul ADCC. Activitatea lor este influențată negativ de infecția cu HIV. Proteina *Tat* extracelulară, eliberată de celulele infectate, poate să interfere cu citotoxicitatea naturală a celulelor NK asupra țintei: *Tat* se leagă de canalele de Ca^{2+} ale celulei NK și inhibă calea de semnalizare care declanșează degranularea.

Amplitudinea infecției primare este parțial represată de efectorii imunitari, simptomele diminuează și viremia scade. Numeroase clone de CTL se *pierd* datorită stimulării antigenice masive. Deși energic, răspunsul imun humoral și celular nu elimină complet virusul liber și nu lizează toate celulele infectate, pentru că epitopii antigenici virali sunt inaccesibili.

Chiar dacă epitopii sunt accesibili, *variația antigenică* a spiculelor virale, face imposibilă recunoașterea de către Ac. Pe măsură ce infecția progresează, treptat se selectează noi *variante antigenice* virale, complet rezistente la acțiunea Ac.

Răspunsul imun primar, humoral și celular represează multiplicarea virală, dar nu elimină complet virusul și nici celulele infectate. Organismul nu se sterilizează deoarece anticorpii specifici anti-HIV, produși în timpul infecției primare, nu au activitate neutralizantă optimă. Răspunsul imun primar este neadecvat, fie cantitativ, fie calitativ. O proporție importantă a virionilor rămân infecțioși. Ineficiența anticorpilor este explicată prin *glicozilarea* excesivă a gp120 (circa 24 de situsuri, pe o secvență de 481 aminoacizi). Grupările glucidice maschează epitopii antigenici și împiedică neutralizarea virusului. Rămân multe celule infectate, în special în ganglionii limfatici, atât limfocite, cât și celulele foliculare dendritice.

În esență, persistența infecției cu HIV și imunodeficiența ulterioară sunt expresia incapacității organismului de a neutraliza virionii în timpul fazei acute a infecției.

În *faza cronică* a infecției, se sintetizează Ac corespunzători RIS, care suferă *fenomenul maturării de afinitate*, se leagă mai eficient de epitopi, având probabil efect neutralizant. Neutralizarea implică legarea Ac de glicoproteinele învelișului, urmată de desprinderea gp 120. Anticorpii neutralizanți, având afinitate mai mare de legare cu epitopii virali, *stimulează* procesul infecțios, deoarece complexul Ag-Ac este recunoscut de macrofage prin intermediul receptorului pentru Fc sau pentru C_3.

Latența clinică corespunde perioadei de *infecție cronică productivă*, dar simptomele SIDA lipsesc. Latența are o durată variabilă: de la *câteva luni, până la 16 ani*[*].

[*] Durata ei este anticipată de încărcătura virală la 6 luni după infecție: pacienții cu mai puțin de 10^5 ARN HIV/ml de plasmă supraviețuiesc cel puțin 5 ani înainte de faza clinică; cei care au mai mult de 10^5 ARN HIV/ml vor avea o latență clinică mai scurtă.

Virusul diseminat sistemic infectează tot mai multe celule T în organele limfoide secundare și titrul viral sanguin crește progresiv. Zilnic se eliberează circa 10^9–10^{11} virioni. Proporția limfocitelor

producătoare de virus este de 1/40. În perioada latenței clinice, cantitatea de ARN în plasmă atinge 10^7 copii ARN HIV/ml, echivalent cu 5 x 10^6 virioni/ml. Virusul se multiplică cu o rată înaltă de erori, pe măsură ce celulele infectate devin permisive. Ac specifici și CTL mențin viremia la un nivel scăzut și semnele clinice nu apar.

Răspunsul celulelor T. Activarea celulelor T de către Ag nonself implică prezentarea epitopilor în asociație cu moleculele CMH I și CMH II. HIV-1 activează celulele T prin interacțiunea directă a gp 120 cu CD_4. Ca urmare a interacțiunii, miliarde de limfocite TCD_4 (2 x 10^9) sunt lizate zilnic. Numărul lor scade progresiv, deoarece pierderea nu este compensată integral de producția medulară. Cauza principală a morții limfocitelor TCD_4 este *liza* consecutivă infecției cu HIV, deoarece proteinele virale au efect toxic. Legarea HIV sau a gp 120 de membrana limfocitului induce creșterea volumului celular și pierderea echilibrului hidroelectrolitic. Aceste modificări s-au reprodus *in vitro* cu gp 120. Efectul toxic al gp 120 este reversat de antagoniștii canalelor de Ca^{2+}, utilizați în clinică pentru a atenua anomaliile neurologice consecutive infecției cu HIV.

O proporție semnificativă de limfocite, după legarea gp 120 la CD_4, se sinucid prin *apoptoză* (activarea programului genetic al morții) sau prin interacțiunea ligandului Fas cu receptorul Fas. O altă cauză a ID o constituie *anergia* limfocitelor, definită de incapacitatea limfocitelor de a secreta IL-2 consecutiv stimulării pe calea RCT. Glicoproteina 120 asociată necovalent cu gp 41, sintetizată în exces, este ușor eliberată de pe suprafața celulei și a învelișului viral, circulă liberă în sânge, este preluată de CPA și prezentată RCT, blocând reactivitatea limfocitelor. Starea de anergie poate fi reversată sub acțiunea stimulatoare a IL-2. Complexele imune gp 120- anti gp 120 s-au identificat pe suprafața limfocitelor, la pacienții infectați cu HIV.

Infecția macrofagelor are rol determinant pentru patogeneza HIV-1. *In vivo* este infectat un număr mic de monocite, dar ele formează un rezervor de virus infecțios pentru că rămân viabile o lungă perioadă de timp după infecție. Tulpinile care infectează macrofagele se transmit mai ușor prin placentă și prin contactul sexual și produc scăderea mai rapidă a limfocitelor TCD_4.

Monocitele și celulele TCD_4 au același receptor CD_4, dar tabloul citokinelor eliberate este diferit.

Gp 41 este implicată în activarea C, dar proteinele C nu lizează virionii HIV-1. Virionii tapetați cu proteinele C au o infecțiozitate superioară, deoarece virusul pătrunde în celulă prin intermediul receptorilor pentru C. Localizarea HIV-1 pe suprafața CDF este dependentă de interacția C cu receptorii pentru C.

Imunodeficiența consecutivă infecției cu HIV.

Imunopatogeneza infecției cu HIV-1, asociată cu imunosupresia severă, paradoxal, se instituie odată cu activarea răspunsului imun. Stimularea sistemului imunitar la pacienții SIDA este demonstrată de nivelul crescut al citokinelor proinflamatorii: IL-1, IL-6, GM-CSF, TNFα, TNFβ, în ser și în LCR.

Scăderea amplă a numărului de limfocite TCD_4, detectabilă în testul transformării blastice cu mitogene, anulează funcția lor reglatoare asupra funcției imunitare. Limfocitele viabile asigură persistența infecției. Diminuarea sintezei IL-2 încetinește proliferarea și diferențierea limfocitelor Tc. În absența celulelor Tc activate, multiplicarea virală este necontrolată. Consecutiv scăderii sintezei IL-2 diminuează activitatea macrofagelor și a celulelor NK.

Evoluția tipică a infecției se manifestă la 70–80% dintre cei infectați. Perioada de latență este asociată cu un număr de peste 500 limfocite $TCD_4/\mu l$.

HIV nu se multiplică în *limfocitele B*, dar activitatea lor este perturbată sever. Numărul celulelor B diminuează drastic, datorită epuizării clonale. Proteina 120 se leagă de Ig membranară și acționează ca un *superantigen*, producând *activarea policlonală*, nespecifică, a celulelor B. Titrul Ac (IgG și IgA) este de circa 10 ori mai mare decât valorile normale, dar numai 20% dintre ei au specificitate anti-HIV. Restul nu sunt protectori nici față de alți agenți patogeni sau potențial patogeni. Celulele B ale pacienților SIDA sunt deficiente în capacitatea de a sintetiza Ac specifici față de diferite Ag. Explicația creșterii titrului Ac este că, în absența limfocitelor TCD_4, celulele Ts nu-și îndeplinesc rolul fiziologic de a supresa activarea policlonală a limfocitelor B, diferențierea și sinteza Ig.

Latența clinică *se încheie* când SI nu mai elimină agenții patogeni oportuniști. Titrul Ac anti-HIV și numărul limfocitelor TCD_8 scad, gp virală 24 reapare în sânge (ca și în perioada acută a

infecției), titrul viral crește mult. Rețeaua CDF în ganglioni este înlocuită cu un infiltrat de fibroblaste sau de celule grase. Virusul captat anterior pe suprafața CFD este eliberat și viremia crește, iar numărul celulelor TCD_4 scade sub 200/mm^3 de sânge. Capacitatea de RI scade sever.

Manifestarea clinică a SIDA este marcată de apariția *infecțiilor oportuniste* și este asociată cu scăderea numărului de limfocite TCD_4 circulante la valori mai mici de 200/µl. Uneori, progresia maladiei este asociată cu selecția tulpinilor mai virulente, ce utilizează receptorul pentru chemokine.

Imunodeficiența gravă este consecința directă a scăderii dramatice a numărului de limfocite TCD_4 circulante, de la circa 1000 la 100/µl. Proporția limfocitelor producătoare de virus în stadiul avansat este 1/10.

Stadiul clinic al infecției este dominat de efectele TNF, un activator al genomului HIV integrat și inductor al stării caşectice. Caşexia favorizează deteriorarea activității SNC. *In vitro*, IL-1, TNF și IL-6 induc proliferarea sarcomului Kaposi și favorizează multiplicarea HIV în celulele sanguine periferice.

Se pare că HIV pătrunde în SNC curând după infecție. În stadiile tardive ale infecției, în creier s-a evidențiat un număr mare de celule *microgliale* infectate cu HIV. Infecția SNC este asociată cu anomalii neurologice de diferite grade, comune (la 40–90% dintre pacienți): encefalopatie, neuropatie periferică, iar cea mai gravă este complexul SIDA demențial (sindromul HAD = HIV associated dementia). Virusul este transportat în creier, prin monocitele infectate care depășesc bariera sânge-creier și eliberează citokine toxice pentru neuroni. În creier, celulele infectate sunt monocitele și microglia. HIV intră în microglie pe calea CD_4 și a co-receptorilor pentru chemokine CCR_3, CCR_5 și $CXCR_4$, cel mai important fiind CCR_5. *În vitro*, HIV-1 poate infecta linii celulare CD_4^-, probabil prin intermediul galactocerebrozidei (Gal C). Microglia infectată nu este lizată de multiplicarea virală, constituie un rezervor de virus și eliberează neurotoxine: compuși icozanoidici, PAF, TNF-α, IL-1β, IL-6, NO, care induc apoptoza neuronilor.

În esență, SIDA constă în aceea că, în absența unui răspuns imun specific humoral și celular, bolnavul face infecții repetate și tot mai grave cu virusuri și cu microorganisme oportuniste, care în condițiile unei reactivități imunitare normale sunt inofensive. Tuberculoza este cauza mortalității consecutive infecției cu HIV în țările în curs de dezvoltare, iar pneumonia cu *Pneumocystis carinii*, în țările dezvoltate. Când numărul limfocitelor scade sub 50/mm^3, în absența terapiei, moartea este iminentă.

Uneori, la bolnavii SIDA apar malignități: cel mai comun este sindromul Kaposi, ce se manifestă prin apariția nodulilor vasculari multipli în vasele din tegument și din viscere.

La copiii infectați perinatal, în primii ani, SIDA evoluează rapid deoarece sistemul lor imunitar este imatur și au prognostic rezervat.

Tropismul acestui virus pentru limfocitele CD_4, pe care le infectează și le lizează, reprezintă o *experiență a naturii*, care a confirmat rolul fundamental al limfocitelor CD_4, ca elemente reglatoare esențiale ale reactivității imunitare. SIDA reproduce tabloul clinic al sindromului de epuizare (''wasting disease''), care se instalează după timectomia neonatală la animale, descris de R. Good(1962).

Sensibilitatea la infecție și timpul de progresie a infecției cu HIV la maladia SIDA variază mult datorită variației genetice a virusului și a gazdei:

- unele tulpini virale sunt atenuate în mod natural și progresia maladiei este mai lentă;
- tipul HLA ale gazdei poate fi important: homozigoția moleculelor HLA I este asociată cu progresia mai rapidă. Diferitele tipuri de HLA sunt asociate cu prognoze diferite: HLA-B57 și HLA B27, cu progresie mai lentă, iar HLA B35, cu progresie mai rapidă.

Cazurile de rezistență la infecția cu HIV sunt rare și se datorează unei mutații în receptorul R5 al chemokinei CC cu rol de co-receptor pentru pătrunderea HIV în limfocitele TCD_4. Rezistența este asociată cu deleția parțială a CCR_5 la $CCR_5\delta32$*, care excizează 32 nucleotide din secvența genei și introduce schimbarea cadrului de citire, cu sinteza unei proteine nefuncționale.

* Studiul a 1955 indivizi cu CCR5 homomozigoți (++) sau heterozigoți (+ –) a evidențiat că au fost HIV pozitivi. Nici unul (0 din 17) dintre cei CCR5δ32 nu a fost HIV pozitiv. Cei heterozigoți progresează mai lent (cu 2–3 ani) spre stadiul clinic al bolii. Concluzia este că CCR5δ32 este o alelă care conferă protecție solidă anti-HIV.

Foarte interesanți pentru cercetători sunt două grupe mici de indivizi:

– indivizii cu *infecție HIV pe termen lung,* dar maladia nu progresează. Virusul se multiplică cu o rată scăzută. Serul conține mai puțin de 50 de copii de ARN/ml. Factorii genetici ai gazdei, controlul imunologic al multiplicării și/sau infecția cu o tulpină atenuată de HIV pot să explice acest tip de infecție;

– indivizii *seronegativi,* cu expunere repetată la antigenele HIV, dar nu fac maladia și nu au viremie detectabilă. Indivizii, probabil, au limfocite TCD_8 specifice pentru antigenele virale dintr-o expunere anterioară la antigene care dau reacție încrucișată cu antigenele HIV. Sunt foarte interesanți pentru dezvoltarea unui vaccin.

Persoanele care pierd ambele alele codificatoare ale co-receptorului CCR_5 sunt virtual imune la infecție.

Transmiterea se face pe următoarele căi:

– contactul hetero- sau homosexual;

– prin sânge și derivatele lui;

– prin acele și seringile contaminate, în special la cei care își injectează iv droguri;

– pe verticală, de la mamă la făt în timpul vieții intrauterine sau la naștere. Mai puțin de 20% dintre copiii născuți de mame HIV pozitive se nasc HIV pozitivi. Anticorpii materni anti-HIV traversează placenta, iar testul pozitiv la un copil nu indică infecția;

– transmiterea verticală, după naștere prin secreția lactată.

Nu toate fluidele transmit infecția, deoarece titrul viral variază considerabil.

Diagnosticul. Metoda curentă de determinare a infecției cu HIV este cea *serologică*, ce constă în evidențierea Ac specifici în ser, într-o reacție cu antigenele HIV din trusa ELISA. Testele ELISA comerciale sunt sensibile și specifice, cu puține rezultate fals pozitive sau fals negative. Anticorpii anti-HIV se evidențiază cu antiglobulina umană cuplată cu o enzimă. Antigenul HIV este un amestec de proteine recombinante (p41, p24) sau peptide sintetice ale epitopilor dominanți.

O altă variantă serologică utilizează microparticule tapetate cu antigene HIV brute inactivate. În prezența Ac specifici, microparticulele aglutinează.

Testul parcurge 3 etape:

a) Ac antiHIV din serul cercetat se leagă de Ag HIV, fixat în suportul test;

b) Ac legați sunt evidențiați cu IgG de iepure anti-IgG umană, marcat cu enzimă;

c) În prezența Ac anti-HIV, enzima formează un produs colorat de reacție.

Testul EIA are sensibilitate și specificitate de peste 98%. Testul pozitiv trebuie să fie confirmat prin testul western blott sau un test specific de imunofluorescență, care evidențiază Ac anti-p24, anti-p41, anti-p120, anti-p160. Seroconversia are loc la 3–4 săptămâni. Majoritatea pacienților au Ac detectabili în 6–12 săptămâni. Virtual, toți pacienții se pozitivează la 6 luni. Extrem de rar, testul Ac rămâne negativ chiar la 6 luni.

Metode *moleculare:* PCR se folosește pentru detectarea ADN proviral, iar RT-PCR pentru detectarea ARN viral.

Diagnosticul timpuriu, înainte de sinteza Ac (seroconversie), al infecției cu HIV constă în detectarea ADN proviral în celulele sanguine sau în alte celule prin metoda amplificării genice (PCR).

Evaluarea încărcăturii virale a plasmei (viremie) este importantă pentru monitorizarea tratamentului antiviral. Metoda de măsurare a viremiei, pentru diagnosticul de rutină, constă în extracția ARN din virioni, prepararea ADNc și amplificarea prin metoda PCR (RT-PCR).

Diagnosticul *neonatal* se bazează pe detectarea acizilor nucleici prin PCR sau a Ag viral prin metoda ELISA.

Cultivare. HIV se izolează din fluidele și din celulele tractului genital: lichidul spermatic, secrețiile vaginale; din limfocite, plasmă, LCR, lacrimi, salivă, urină și din secreția lactată. În tractul genital, virusul răspunde foarte puțin terapiei antivirale. *In vitro,* HIV se multiplică, de obicei, în celulele originare de la gazda naturală sau de la specii strâns înrudite. HIV poate fi propagat pe termen scurt în culturi de celule TCD_4 și de mononucleare sanguine stimulate cu PHA și IL-2.

Tulpinile Sin se adaptează și se multiplică în liniile TCD_4 imortalizate, care devin producătoare cronice de virus. Tulpinile NSin se multiplică cu randament scăzut în celulele mononucleate separate din sângele periferic (PBMC).

In vitro, HIV infectează celule CD_4^-: astroglia, neuronii, celulele derivate din carcinomul colorectal, celule precursoare din măduva osoasă, hepatoma, glioma, neuroblastoma. Infecția acestor celule de către HIV este mai puțin eficientă decât a celulelor limfoide CD_4^+.

HIV se poate cultiva din limfocitele periferice. Numărul celulelor infectate variază în funcție de stadiul infecției. Titrul viral înalt se găsește în plasma și în celulele sanguine periferice la pacienții cu sindromul clinic. Cea mai sensibilă metodă de izolare a virusului este de a *co-cultiva* proba de analizat, cu celulele mononucleare neinfectate din sângele periferic, stimulate cu mitogen. Izolatele primare de HIV se multiplică foarte lent, comparativ cu tulpinile adaptate *in vitro*. Multiplicarea virală se detectează prin testarea supernatantului culturii, după 7–14 zile, pentru RT sau pentru antigenele virale. Majoritatea persoanelor pozitive pentru Ac anti-HIV, au și virus circulant ce poate fi cultivat din sânge. Metoda fiind laborioasă și costisitoare se folosește în laboratorul de cercetare și nu pentru diagnosticul de rutină a infecției cu HIV.

Obținerea *vaccinului* ridică dificultăți majore pentru că virusul suferă mutații rapide și nu se exprimă în toate celulele infectate. Izolatele de HIV, chiar cele succesive de la același pacient, sunt foarte variabile din punct de vedere antigenic. Diferențele antigenice se manifestă în special pentru antigenele glicoproteinelor de înveliș. Variația, reflectă probabil apariția mutantelor rezistente la neutralizare. Pe de altă parte, în organismul infectat, virusul se propagă atât ca virus liber, cât și prin contactul intercelular, fără ca virionii să se expună contactului cu efectorii RI. Un vaccin eficient trebuie să stimuleze IMH și IMC protectoare și să protejeze organismul de infecția cu variatele subtipuri antigenice.

În absența măsurilor de control, singura cale de a evita răspândirea epidemică a HIV este eliminarea factorilor de risc: sângele se testează pentru prezența Ac. Infecția este transmisă chiar de pacienții asimptomatici, prin sânge sau prin contact sexual. Persoanele pozitive nu donează sânge, organe, țesuturi, spermă.

Alte retravirusuri limfotrope. HTLV I și II (*H*uman *T L*ymphotropic *V*irus), BLV (*B*ovine *L*eukemia *V*irus), la care se adaugă virusuri simiene cu tropism pentru limfocitele T, formează un grup de agenți infecțioși strâns înrudiți.

HTLV I, descoperit de R. Gallo (1980) într-o linie de celule T transformate, derivate de la un pacient cu leucemie, produce infecții, de obicei asimptomatice, dar este asociat cu maladii inflamatorii și cu ATLL (adult T leukaemia / limphoma). Celulele ATLL sunt CD_3^+, CD_4^+ și CD_{25}^+ (receptorul pentru IL-2). În forma leucemică apar celule caracteristice polilobate. Celulele malignizate sunt mature, dar neoplazia este foarte agresivă.

Patologia asociată cu HTLV II este puțin cunoscută, dar virusul s-a izolat din celulele leucemiei păroase. Acestea sunt de regulă, limfocite B. HTLV II imortalizează celulele T *in vitro*, dar nu se cunosc proprietățile sale oncogene.

HTLV I și II sunt virusuri de tip C și se multiplică în linii celulare imortalizate obținute de la pacienți.

Infecția celulelor T *in vitro* necesită co-cultivarea cu o linie celulară producătoare de HTLV și tratamentul cu mitomicină C.

HTLV I și II se transmit numai prin intermediul celulelor infectate (transfuzie sanguină, prin limfocitele din laptele matern și prin contact sexual, dar nu prin plasmă sau prin alte fracții acelulare). *In vitro*, celulele sensibile formează sincitii la contactul cu celulele producătoare de virus.

BLV produce leucemia limfocitelor B la o proporție mică dintre bovinele infectate

Retravirusurile *aviare* se transmit congenital prin infecția cu virusul excretat din oviduct în albumină. Virusul se transmite pe verticală prin genomul integrat în linia germinală. Celulele somatice și germinale ale puilor de găină poartă genomul viral complet sau cu defect de multiplicare. Fiecare celulă poartă 5–30 genomuri virale integrate, denumite locusuri virale endogene. Unele au capacitatea să devină exogene și implicit transmisibile pe orizontală. Retravirusurile defective endogene se pot exprima numai dacă funcțiile genice defective sunt suplinite de un virus helper suprainfectant, fenomen denumit complementație. Virusul endogen poate fi indus de radiația x, de agenți chimici (pirimidine halogenate).

Virusurile endogene sunt secvenţe de ADN înrudite cu retravirusurile exogene, netranscrise în mod obişnuit, sunt moştenite în linia germinală probabil a tuturor vertebratelor, unde se comportă ca gene mendeliene stabile. În genomul vertebratelor sunt circa 1000–2000 de copii de provirusuri endogene sau elemente provirus-like, majoritatea cu structura caracteristică a secvenţelor LTR, rămăşiţe ale retravirusurilor infecţioase.

Virusurile endogene pot fi copii complete ale provirusului ADN, dar în mod obişnuit nu se manifestă ca particule virale infecţioase, deoarece nu realizează un ciclu complet de multiplicare. Ciclul de multiplicare şi asamblarea virionilor pot fi induse de raze x, pirimidine halogenate, inhibitori ai sintezei proteice, citokine proinflamatorii, hormoni steroizi, când virusurile endogene se exprimă ca virioni compleţi, infectioşi.

Agenţii chimici (5-azacytidina) reversează metilarea ADN şi induc expresia, cel puţin tranzitorie, a provirusurilor endogene. De exemplu, şoarecii AKR devin viremici.

Provirusurile endogene, cu excepţia MMTV, nu sunt patogene şi sunt mai puţin eficiente în ciclul multiplicării, comparativ cu cele exogene.

În stare latentă, provirusurile endogene pot fi considerate ca *elemente genetice egoiste*, care au derivat cu mare probabilitate din infecţiile cu virusuri exogene, dar s-au adaptat la rezidenţa în linia germinativă.

Probabil 5–10% din totalul genelor mamaliene sunt dobândite prin mecanismul transcrierii inverse. Unele dintre elementele provirus-like, denumite *retrotranspozoni*, adeseori transpozează sau se rearanjează via reverstranscrierii ARNm: de exemplu, transpozonii levurilor şi unele elemente genetice ale plantelor sunt mobile în interiorul genomului, prin mecanismul reverstranscrierii. Retrotranspozonii se deosebesc de retravirusurile exogene, prin absenţa fazei de virion.

Retrotranspozonii sunt o sursă continuă de transpoziţie genică şi mutageneză prin inserţie şi sunt un rezervor al LTR, care sunt activatori potenţiali ai transcrierii.

Retravirusurile acţionează ca agenţi transductori, se comportă ca mutageni prin inserţie, induc o varietate de neoplazii şi pot fi agenţi cauzatori ai multor imunodeficienţe, ai unor maladii autoimune (artrita) şi anemii.

Bibliografie

Atwood W. J., Berger J. R., Kaderman R., Tornatore C. S., Major E. O. 1993. Human Immunodeficiency Virus type 1 infection of the brain – Clin. Microbiol. Rev, vol. 6, pp. 339–366.

Cullen B. R. 1992. Mechanisms of Action of Regulatory Proteins Encoded by Complex Retroviruses. Microbiol. Rev. 56(3): 375–394.

Coffin J. M. 1990. Retroviridae and Their Replication, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Levy J. A. 1993. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection – Microbiol. Reviews vol. 57, no. 1, pp. 183–289.

Nowak M. A ., McMichael A. J. 1995. How HIV Defeats the Immune System. Sci. Amer, August.

Pantaleo G., Fauci A. S. 1996. Immunopathogenesis of HIV Infections. Annu. Rev. Microbiol. 50, pp. 825–854.

Elder J. H., Phillips T. R. 1995. Feline Immunodeficiency Virus as a Model for Development of Molecular Approaches to Intervention Strategies Against Lentivirus Infections. Adv. in Virus Research, vol. 46. pp. 225–247.

Hirsch M. S., Curran J. 1990. Human Immunodeficiency Viruses. Biology and Medical Aspects, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Wong-Staal F. 1991. Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Urnovitz H. B., Murphy W. H. 1996. Human endogenous retroviruses: nature occurrence and clinical implications in human disease. Clin. Micr. Rev. 9, 72–99.

Bryan Rock R., Gekker G., Hu S, Sheng W.S., Cheeran M., Lokensgard J.R., Peterson P.K. 2004. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. Clin. Microbiol. Rev., 17: 942–964.

Chirmule N., Pahwa S. 1996. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions – Microbiol. Rev. 60(2): 386–406.

Bour S., Geleziunas R., Wainberg M. A. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD_4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection – Microbiol. Rev. 59(1): 63–65.

Guntaka R. V. 1993. Transcription termination and polyadenylation in retroviruses – Microbiol. Rev. 57(3): 511–521.

Cullen B. R. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. Microbiol. Rev., 56 (3): 375–394.

Norkin L. 1995. Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and Design of Antiviral Agents – Clin. Micr. Reviews 8, 2, pp. 293–315.

Clements J. E., Christine Zink M. 1996. Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infections. Clin. Micr. Reviews 9, 1, p. 100–117.

Mişcalencu D., Mailat F., Mihăescu Gr. 1980. Chicken liver cells in the presence of Rous sarcoma in organism – Rev. Roum. Biol. 25, 1, 51–57.
Weiss R. A., Dalgleish A. G., Loveday C., Pillay D. 2004. Human Immunodeficiency Viruses, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.
Jobling M. A., Hurles M. E., Tyler Smith C. 2004. Human evolutionary genetics, Garland Press.
Taylor G. P. 2004. The Human T Cell lymphotropic Viruses, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie.
Zuckerman J., Banatvala J. E., J. R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

21.19. *Mimivirus*

Etimologic, denumirea vine de la *mi*micking *mi*crobe virus. *Mimivirus* a fost descoperit în 2003 (Scola şi colab.). Prin dimensiuni – 750 nm diametru, prin lungimea genomului – 1,2 milioane bp, prin diversitatea proteinelor codificate – 911 proteine, *Mimivirus* a zdruncinat graniţele care păreau impenetrabile, între virusuri şi organismele parazite intracelular.

În 1992, o epidemie de pneumonie în West Yorkshire (Anglia) a determinat iniţierea investigării *Legionella* în apa din apropierea unui turn de răcire. A fost analizată *Acanthamoeba polyphaga*, în speranţa găsirii *Legionella*, suspectând relaţia ecologică a celor două organisme, dar în citoplasma amoebei s-a evidenţiat, pe imaginile electrono-optice, un parazit asemănător unui coc de dimensiuni mici. Parazitul nu a crescut pe mediile bacteriologice şi nici nu s-au identificat genele pentru sinteza ARNr 16S, markerul genetic cel mai bine conservat la procariote.

Morfologie. Regiunea centrală a virionului este alcătuită dintr-o capsidă icozaedrică şi genomul format din 1,2 milioane pb. Capsida este înconjurată de 2 straturi lipidice, iar la exteriorul acestora, un strat dens de fibre (fig. 438). Natura chimică a fibrelor ce se proiectează din stratul extern al particulei, nu este certă: sunt compuşi colagen-like, legaţi încrucişat într-o reţea densă şi sunt glicozilaţi. Proteinele presupuse că fac parte din stratul de fibre nu s-au detectat în proteomul particulei virale. Probabil legăturile transversale le fac insolubile şi le exclud din EF în gel şi din analiza spectroscopiei de masă. Aceiaşi explicaţie este valabilă şi pentru alte proteine majore ale capsidei, care nu se evidenţiază la analiza proteomică.

Stratul extern al virionului se aseamănă cu peretele celulei bacteriene, ceea ce explică retenţia colorației Gram. Stratul extern mediază interacţia cu amoeba, fagocitoza fiind declanşată atât de dimensiunile mari, cât şi de catenele glucidice. *Mimivirus* este împachetat în stratul extern. Digestia fibrelor stratului extern în vacuola de fagocitoză este o condiţie pentru infecţia productivă. Specificitatea virusului pentru gazda *Acanthamoeba* poate fi datorată prezenţei enzimei ce degradează învelişul de fibre în fagosom.

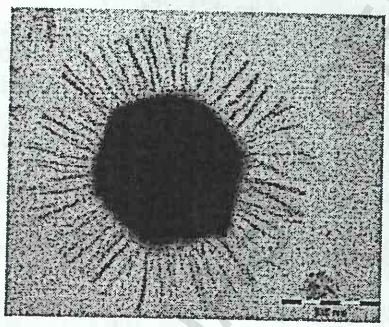


Fig. 438. Structura unei particule de *Mimivirus* în secţiune, la microscopul electronic în transmisie. Capsida de formă hexagonală are simetrie icozaedrică. În regiunea centrală, nucleoidul electrono-dens are aceiaşi formă. La periferie se observă reţeaua de fibrile bine organizată (după Raoult şi colab., 2007).

Unele proteine codificate au funcţii speciale, neîntâlnite la virusuri. Prin complexitatea repertoriului genic (911 proteine codficate) şi prin compoziţia particulei (conţine produsele a peste 130 de gene), *Mimivirus* se distinge de celelalte virusuri.

Genomul este reprezentat de o singură moleculă de ADN dc, cu lungimea de 1.184.404 pb, organizate în 911 gene. Două secvenţe inversate de circa 900 nt aproape de ambele extremităţi sugerează că genomul poate adopta topologie circulară. Circa 1/3 dintre gene au cel puţin un paralog – gene asemănătoare – rezultate prin duplicare. În structura genomului se găsesc gene ce codifică componente centrale ale aparatului de transcriere şi de traducere, considerate specifice organismelor celulare: genele ce codifică ARNt-sintetazele.

Secvenţierea genomului a evidenţiat asemănarea filogenetică a *Mimivirus* cu virusurile ADN mari nucleo-citoplasmatice (NCLDV), un grup în care sunt incluse *Pox-*, *Phycodna-* (infectează algele), *Irido-* (infectează peştii), *Asfarviridae*.

Noul virus (*A. polyphaga Mimivirus*) nu trece prin porii filtrului de 0,3 μm, o procedură experimentală obişnuită pentru separarea bacteriilor de virusuri.

După infecţia experimentală a culturii de *A. polyphaga, Mimivirus* are un ciclu de multiplicare tipic viral: faza de eclipsă (5 h după infecţie), urmată de apariţia virionilor progeni, care treptat ocupă cea mai mare parte a volumului citoplasmei. Celula amoebiană începe să se lizeze la 14 ore după infecţie şi eliberează circa 300 virioni progeni. Ciclul de multiplicare este citoplasmatic.

Mimivirus rămâne infecţios după un an la temperatura 4–32° în tampon neutru.

Ciclul de multiplicare

- virionii sunt endocitaţi de amoebă în procesul hrănirii;
- în vezicula de endocitoză, stratul de fibrile asemănătoare celor de LPS este parţial digerat, iar suprafaţa capsidei este accesibilă interacţiunii cu membrana vacuolei;
- conţinutul capsidei este eliberat în citoplasmă, probabil prin fuziunea membranei interne lipidice a virionului cu membrana fagosomului. Particula virală nudă este eliberată în citoplasmă;
- transcrierea genelor timpurii şi timpurii-târzii, probabil sub controlul promotorului bine conservat, utilizând aparatul de transcriere codificat şi împachetat de virus.

Mimivirus are o compoziţie chimică complexă:

- un set complet de enzime de reparare a ADN, capabile să corecteze împerecherile greşite ale nucleotidelor, precum şi erorile induse de factori oxidanţi, radiaţia UV, agenţii alkilanţi;
- este singurul virus care codifică 3 tipuri de topoizomeraze (IIa, Ib asemănătoare cu cea de la pox, Ia);
- posedă enzime care modifică polizaharidele, aminoacizii şi lipidele. Lipazele pot fi implicate în ruperea membranei gazdei *Acanthamoeba* şi eliberarea virusului progen;
- *4 aminoacil-ARNt sintetaze* specifice pentru Tyr, Arg, Cys şi Met, considerate ca fiind caracteristice organizării celulare;
- enzimă ce bonetează ARNm;
- mai mulţi factori de iniţiere a sintezei proteinelor;
- 6 gene ce codifică pentru ARNt: 3 $ARNt_{leu}$, $ArNt_{trp}$, $ARNt_{his}$, $ARNt_{cys}$.

Analiza genetică a evidenţiat un promotor foarte bine conservat la 50% dintre gene. Ar fi 2 categorii de gene:

- unele cu promotori recunoscuţi de ARN-pol virală;
- celelalte, fără un promotor conservat, pot fi transcrise de ARN-pol gazdei, recrutată din nucleul amoebei.

Spectrul îngust de gazdă este în conflict cu rapoartele ce sugerează că *Mimi-* poate fi un patogen amoebian ca şi *Legionella* şi ar putea cauza pneumonia la om. Serul unor pacienţi cu pneumonie comunitară sau nosocomială reacţionează încrucişat cu *Mimi-*, iar ADN *Mimi-* s-a găsit în probele respiratorii ale unui pacient cu pneumonie nosocomială. Serul pacienţilor reacţionează cu numeroase proteine de *Mimi-*, cele mai multe fiind unice pentru acest virus, ceea ce face puţin probabilă reacţia încrucişată cu alţi patogeni. *Mimivirus* n-a fost izolat de la pacienţi, dar poate fi considerat ca agent potenţial al pneumoniei.

Bibliografie

Clarence J. M., Abergel C., Ogata H. 2009. Mimivirus – Current Topics in Microbiol. and Immunol., vol. 328, Editor James van Etten, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Claverie J. M. 2008. Mimivirus – în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Raoult D., La Scola B., Birtles R. 2007. The discovery and characterization of Mimivius, the largest known putative virus and putative pneumonia agent. Clin. Infect. Dis. 45: 95–102

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

22. RĂSPUNSUL IMUN ANTIVIRAL

Infecţiile virale constituie, încă, o cauză majoră a morbidităţii şi mortalităţii, deşi vaccinarea a redus incidenţa infecţiilor severe (polio, oreion, rujeolă, rubeolă) şi a eradicat variola. Cunoaşterea mecanismelor răspunsului imun antiviral este importantă pentru evaluarea problemelor clinice de fond (de exemplu, dinamica răspunsului imun) şi pentru căutarea unor noi metode de obţinere a vaccinurilor.

Interacţiunea virusurilor cu organismele este modulată de sistemele de apărare înnăscute şi dobândite. Pentru a se perpetua într-o populaţie, virusul trebuie să fie virulent, dar suficient de flexibil în modularea virulenţei, pentru a se păstra în populaţia sensibilă. In perspectivă evolutivă, interacţiunea virusului cu organismul sensibil trebuie să confere superioritate virusului. Dacă este prea virulent şi nu poate fi controlat de imunitatea gazdei, rezultatul poate fi moartea şi în final dispariţia gazdei. Dacă este lipsit de virulenţă, virusul va fi eliminat prea rapid de sistemul imunitar al gazdei şi poate să dispară prin incapacitatea de a se perpetua.

Adeseori, virulenţa virală este diminuată prin *mutaţie* şi în acelaşi timp se selectează gazde mai bine adaptate imunitar, rezultând un echilibru fluctuant, în care coexistă atât gazda, cât şi virusul.

22. 1. Mecanisme nespecifice (înnăscute) de protecţie antivirală

Imunitatea antivirală înnăscută acţionează rapid, este mediată de bariere *fizice* (tegument, membranele mucoase ale tractului gastro-intestinal, respirator şi urogenital), chimice şi biologice, dar şi de factori genetici (absenţa receptorului pentru un anumit virus: de exemplu, şoarecele nu este sensibil la virusul polio pentru că îi lipsesc receptorii specifici).

Protecţia *chimică* este conferită de secreţia acidă din stomac şi vagin sau de enzime (lizozimul) secretate pe suprafaţa barierelor fizice.

Protecţia biologică este conferită de microbiota rezidentă. Bacteriile produc substanţe antimicrobiene ce inhibă atacul potenţialilor invadatori.

Dacă barierele fizice, chimice şi biologice sunt depăşite, agentul infecţios pătrunde în mediul intern şi intră în acţiune cea de a II-a linie de protecţie reprezentată de macrofage, CD şi neutrofile. Ele fagocitează agentul invadator şi produc IFN.

22.1.1. Imunitatea nespecifică mediată celular

Imunitatea celulară înnăscută antivirală este mediată de *celulele dendritice* (CD), *macrofage* şi *celulele NK*.

Celulele cu rol în apărarea nespecifică recunosc un grup de molecule ale agenţilor infecţioşi cunoscut sub denumirea generică de *tabloul molecular asociat patogenilor* (PAMP = pathogen associated molecular patterns), iar moleculele gazdei ce recunosc structurile patogenilor formează *tabloul receptorilor de recunoaştere* (pattern recognition receptors = PRR). PRR pentru detectarea Ag virale fac parte din familia TLR (Toll like receptors - TLR 3, 4, 7, 8, 9).

TLR se exprimă pe CD şi macrofage, ce au rol în declanşarea RI înnăscut, dar sunt şi CPA pentru iniţierea RI adaptativ. TLR recunosc ARN dc sau ARN mc viral bogat în G şi U al virusurilor influenza şi HIV.

CD preiau Ag la locul infecţiei, se activează, eliberează citokine activatoare ale celulelor tisulare învecinate şi migrează în organele limfoide secundare unde mobilizează celulele T. Se disting

CD *mieloide* (CDm se diferențiază din precursori ai liniei mieloide în MO, ca și monocitele și granulocitele) și CD *plasmocitoide* (CDp se diferențiază din celule precursoare ale liniei limfoide). CDm sunt celulele Langerhans și CD interstițiale. Ambele tipuri de CD sunt activate de infecția virală prin receptorii PAMP, intra- și extracelulari.

CDp activate produc cantități mari IFN-α/β. IFN-α/β produc efecte autocrine și paracrine și activează sinteza proteinelor antivirale care limitează diseminarea virusului.

Celulele NK produc citokine antivirale sau lizează celulele țintă într-o manieră nespecifică față de Ag și nu produc memorie imunitară. Ele se activează rapid și la 2–3 zile după infecție ating activitatea maximă, după care diminuează rapid. Deficiențele pentru celulele NK sunt rare, dar sunt însoțite de infecții severe cu virusul varicela zoster, cu virusul citomegalic sau cu herpes simplex 1.

Mecanismul interacțiunii celulei NK cu celula infectată nu se cunoaște. Celulele NK recunosc și lizează celulele care au pierdut moleculele CMH. Activitatea lor este stimulată de IFN.

Moartea celulei țintă survine ca urmare a exocitozei granulelor citotoxice. Celulele NK controlează multiplicarea arena-, paramixo-, HIV, herpes. Activitatea lor este reglată prin semnale pozitive și negative, al căror echilibru determină activarea sau inhibiția celulei NK la contactul cu ținta.

Fagocitele mononucleare (monocitul, macrofagul tisular, CD) au rol important în eliminarea virusului dintr-un proces infecțios, deoarece captează virionii inoculați experimental, iar macrofagele au și activitate ADCC.

Celulele imunității înnăscute și adaptative sunt corelate funcțional: pe suprafața lor se găsesc receptori TLR, puntea de legătură prin care cele două sisteme celulare cooperează și secretă citokine cu efecte sinergice.

Dacă sistemul protector înnăscut nu stopează diseminarea agentului infecțios, este activat *sistemul imunitar adaptativ.*

22.1.2. Interferonii și mecanismele acțiunii lor

Interferonii (IFN) sunt o categorie specială de *citokine*, a căror sinteză este indusă de diferiți agenți chimici sau biologici. Funcțiile lor se caracterizează printr-un spectru larg de activități nespecifice, cea mai importantă fiind *inducția stării antivirale.*

Interferonul a fost descoperit de Isaacs și Lindenmann (1957). Ei au observat că injectarea membranei corioalantoice a embrionului de găină, cu virus influenza inactivat (denumit virus *inductor* sau *interferent*), blochează multiplicarea ulterioară a virusului influenza infecțios (virus *revelator* al interferenței). Autorii au arătat că inhibiția multiplicării virale (interferența) se datorează unui factor inhibitor, pe care l-au denumit *interferon.*

Inducerea stării antivirale este cea mai importantă funcție a IFN, dar ei au și alte activități biologice majore:

- inhibă multiplicarea celulelor normale și tumorale;
- reglează procesele de diferențiere celulară;
- reglează funcția imunitară.

Natura IFN. Toți IFN se sintetizează ca precursori de 166 aminoacizi, cu secvențe semnal N-terminale de 20-23 aminoacizi, necesare secreției. Dimensiunle reale ale catenei polipeptidice sunt de 143, 145 și respectiv de 146 resturi de aminoacizi. Molecula de IFN are două domenii cu secvențe de aminoacizi relativ constante: unul în jumătatea N-terminală, care formează *situsul de legare B* (*binding*) pe receptorul celular, iar celălalt, *A* (*activity*), în jumătatea C-terminală, pare să moduleze legarea de receptor și probabil mediază funcțiile biologice.

Unii IFN pot fi modificați post-traducere prin glicozilare N și O. Interferonii sintetizați de diferite specii de organisme sau de diferite tipuri de celule ale unui organism, prezintă deosebiri ale secvenței aminoacizilor, ale conținutului glucidic și implicit antigenice, care au stat la baza grupării lor în două *tipuri*: *I* și *II.* Antiserul specific față de moleculele de IFN ale unui tip nu precipită și nu neutralizează acțiunea IFN celuilalt tip.

Interferonii de tip I cuprind variantele α, β și *t*, iar cei de tip II includ varianta moleculară *γ*.

IFN α este produs de *leucocite,* inclusiv de *celulele B activate* și este reprezentat de o varietate largă de molecule, codificate de un număr mare de gene. Cele 14 gene codificatoare ale sintezei IFNα

localizate pe brațul scurt al perechii 9 de cromosomi, pot fi împărțite în 2 grupe: o genă de răspuns imediat, indusă rapid, fără să necesite sinteză proteică prealabilă și un set de gene α (2, 5, 6, 8) care sunt induse tardiv și necesită sinteză proteică. Celulele producătoare de IFN α în condiții naturale, sunt precursoare ale celulelor dendritice.

IFN β este sintetizat de variate celule *fibroblastele* infectate cu virus sau stimulate cu ARN dc și de alte țesuturi activate. Sinteza sa este codificată de *o singură genă,* localizată pe brațul scurt al perechii 9 de cromosomi. Interferonul *t,* s-a identificat la bovine și la ovine și este sintetizat în cantități mari în epiteliul uterin, în perioada care precede implantarea embrionului și de aceea s-a denumit IFN trofoblastic.

IFN-α și IFN-β au efecte antivirale asemănătoare și antiproliferative asupra celulelor imunitare și neimunitare.

IFN γ, codificat de o genă localizată pe perechea 12 de cromosomi, singura genă cu introni, este produs de *limfocitele activate* sub acțiunea antigenului specific sau a substanțelor mitogene, de celulele TCD_8^+, NK și reprezintă *IFN de tip II.* Deoarece, *in vivo,* este sintetizat de *limfocitele T activate* și de celulele NK, IFN γ este considerat a fi *de tip imun.*

IFNγ este stimulator al RI, dar este mai puțin antiviral, comparativ cu IFN-α și β.

În general, moleculele de IFN sunt *glicoproteine.* Interferonii α și β au resturi glucidice legate la Asp 80 și respectiv 25 și 97. Majoritatea IFN α nu sunt glicozilați. Glicozilarea nu este esențială pentru exprimarea activităților biologice, ceea ce explică faptul că IFN sintetizați de celulele bacteriene în care s-au clonat genele codificatoare, au activitate biologică.

Interferonii α și β sunt stabili chiar la pH 2 și își păstrează activitatea în prezența SDS, ultima fiind o proprietate foarte importantă pentru purificare.

Inductorii sintezei IFN. In mod obișnuit, celulele normale nu sintetizează cantități detectabile de IFN. Genele codificatoare ale sintezei lor nu sunt transcrise. Sinteza IFN este indusă de diferiți agenți infecțioși: virusuri infecțioase sau inactivate, moleculele de ARN dc helicale, micoplasme, rickettsii și chlamidii, polimerii sintetici, mananii, diferiți activatori metabolici etc. LPS este un bun inductor al IFN α și β.

Pentru virusurile cu genom ARN dc, inductorul sintezei de IFN este chiar genomul viral. Virusurile cu genom ADN, cu excepția celor din grupul pox, sunt slab inductoare, iar cele cu genom ARN mc sunt inductoare ale sintezei IFN, deoarece ARN se replică printr-un intermediar dc.

ARN mc, ADN mc sau dc, ca și hibrizii ADN-ARN nu sunt inductori ai sintezei IFN.

Virusurile inactivate (din vaccinuri), ca și cele ce infectează un substrat nepermisiv sunt inductoare ale sintezei IFN. In leucocitele mononucleate, sinteza IFN este indusă de glicoproteinele învelișului viral.

In vitro, la 37°, sinteza începe la 4 ore după infecția virală și atinge rata maximă concomitent cu sinteza proteinelor virale.

Cel mai bun inductor al sintezei de IFN este ARN dc natural sau sintetic. Mecanismul inducției nu este cunoscut. Probabil, ARN dc induce sinteza unui factor, care, la rândul său neutralizează represorul specific al transcrierii acestor gene. Factorul determinant al inducției este însăși natura bicatenară a moleculei de ARN și nu informația genetică înscrisă în ea. Nu se cunoaște nici mecanismul inducției sintezei IFN γ, în limfocitele activate de antigenul specific sau stimulate de mitogene. Moleculele de ARN dc sau infecțiile virale induc sinteza IFN de tip I (α și β).

Inducția sintezei IFN necesită sinteza ARNm și traducerea sa în catena polipeptidică. Inhibitorii sintezei proteinelor (actinomicina D), administrați simultan cu inductorul, inhibă sinteza IFN. Interferonii se sintetizează, probabil, la toate clasele de vertebrate.

Studiul biochimic al moleculei de IFN a fost ușurat de obținerea AMC specifici față de diferite tipuri de IFN.

Activități biologice efectoare ale interferonilor

Activitatea biologică principală a IFN este cea antivirală și a fost demonstrată experimental. Infecțiile virale sunt mult mai severe la animalele de experiență, cărora, odată cu virusul infecțios li s-a injectat ser imun specific anti-IFN.

Descoperirea IFN a condus la revizuirea conceptului imunității celulare și a rolului său în limitarea infecțiilor virale. Interferonii formează prima linie de apărare umorală față de infecțiile virale, înainte de mobilizarea răspunsului imun. Sistemul *IFN este primul care își exercită efectul protector*, fiind operativ în decurs de *câteva ore* de la infecție. IFN nu au acțiune antivirală directă, ci *induc o stare antivirală* în celulele neinfectate. Interferonii protejează celulele de efectele citopatice virale, dar nu elimină complet infecția. Starea de protecție antivirală, indusă de IFN durează câteva zile și apoi dispare. După câteva zile de absență, starea de protecție poate fi indusă din nou.

Interferonii au specificitate de specie, adică activitățile biologice se manifestă față de orice virus, în raport cu celulele speciei care a produs IFN. Baza specificității de acțiune rezidă în *interacțiunea dintre IFN* și *receptorul celular*. Activitatea biologică a IFN este direct proporțională cu afinitatea lor de legare cu substratul celular. Interferonul de șoarece are, *in vitro*, efect protector față de celulele de șoarece, indiferent de virusul infectant. Același IFN are un efect protector minim (5%) pentru celulele de șobolan, iar pentru celulele umane, efectul protector este nul.

Protecția antivirală este dependentă de concentrația IFN. Dozele mari, administrate în sisteme experimentale, *in vitro*, sunt protectoare față de nivelul scăzut al multiplicității de infecție, asemănător celui natural. Multiplicitatea înaltă de infecție depășește efectul protector al IFN.

Cele mai multe virusuri sunt inductoare ale sintezei IFN și sunt sensibile, în diferite grade, la acțiunea lui. Interferonul este produs de celulele infectate, concomitent cu desfășurarea ciclului multiplicării virale, este eliberat din celule imediat după sinteză și difuzează spre celulele învecinate neinfectate, cărora le induce *starea antivirală*. Astfel, virusul, în ciclul de multiplicare, întâlnește o barieră intracelulară. Nivelul activității antivirale, probabil, este dependent de concentrația extracelulară a IFN. Celulele învecinate celor producătoare de IFN devin cele mai rezistente la infecția cu virus, iar cele mai îndepărtate sunt mai puțin protejate.

Eficiența relativă a diferitelor mecanisme de apărare, inclusiv a celui mediat de IFN, depinde de calea de diseminare a virusului de la poarta de intrare: pe calea fluidelor organismului (sânge, limfă), prin leucocitele infectate sau pe cale axonală. Diseminarea pe cale sanguină și limfatică este limitată de macrofagele asociate capilarelor sanguine și limfatice. Viremia diminuează și odată cu ea, severitatea infecției. Experiențele cu administrarea IFN evidențiază că IFN circulant reduce viremia și protejează organele țintă. Interferonul este mai puțin eficient față de virusurile care se disemineză pe cale axonală.

La pacienții hipogamaglobulinemici, limitarea și eliminarea infecției virale sunt rezultatul acțiunii IFN, a reacției febrile a organismului, a răspunsului inflamator și a IMC.

Bazele moleculare ale activității interferonilor

Interferonii nu au activitate biologică în celulele care îi sintetizează. Principala lor activitate – cea antivirală- nu este directă, deoarece IFN nu sunt molecule efectoare, ci inductori ai stării antivirale (fig. 439). După secreția din celulele producătoare, IFN se leagă de receptorul membranar al altor celule, unde funcționează ca o citokină paracrină și activează un set de gene specifice. Corespunzător celor două tipuri de IFN, se cunosc două tipuri de receptori*. Ambele sunt glicoproteine de membrană, alcătuite din două subunități diferite (heterodimer).

* Transmiterea semnalului în celulă și activarea expresiei genelor este mai bine cunoscută în contextul proteinelor *JAK-STAT*. Proteinele familiei transductoare ale semnalului și activatoare ale transcrierii (STAT) sunt *factori citoplasmatici latenți de transcriere* care sunt fosforilate la Tir, de către tirozin-kinazele familiei *Janus (JAK)*, ca răspuns la acțiunea stimulatoare a citokinelor. STAT-1 și STAT-2 fosforilate recrutează un alt factor (IRF-9) și formează un complex care este translocat în nucleu și se leagă la regiunea promotor a genelor stimulate d IFN, rezultatul fiind starea antivirală și apariția unor modificări ale metabolismului celular.

Sistemul IFNα/β, un component major al RI înnăscut față de infecția virală, este activat timpuriu, activează expresia câtorva sute de gene și se sintetizează proteinele care mediază efectele lor multiple. Starea antivirală este produsă pe mai multe căi. Pot fi inhibate diferite etape ale ciclului de multiplicare virală: pătrunderea în celulă și dezvelirea, transcrierea și traducerea ARNm viral, replicarea genomului, asamblarea și eliberarea virusului progen. Decisivă este natura virusului, dar tipul celular poate avea un rol important. Starea antivirală este, în esență, consecința acțiunii a două mecanisme.

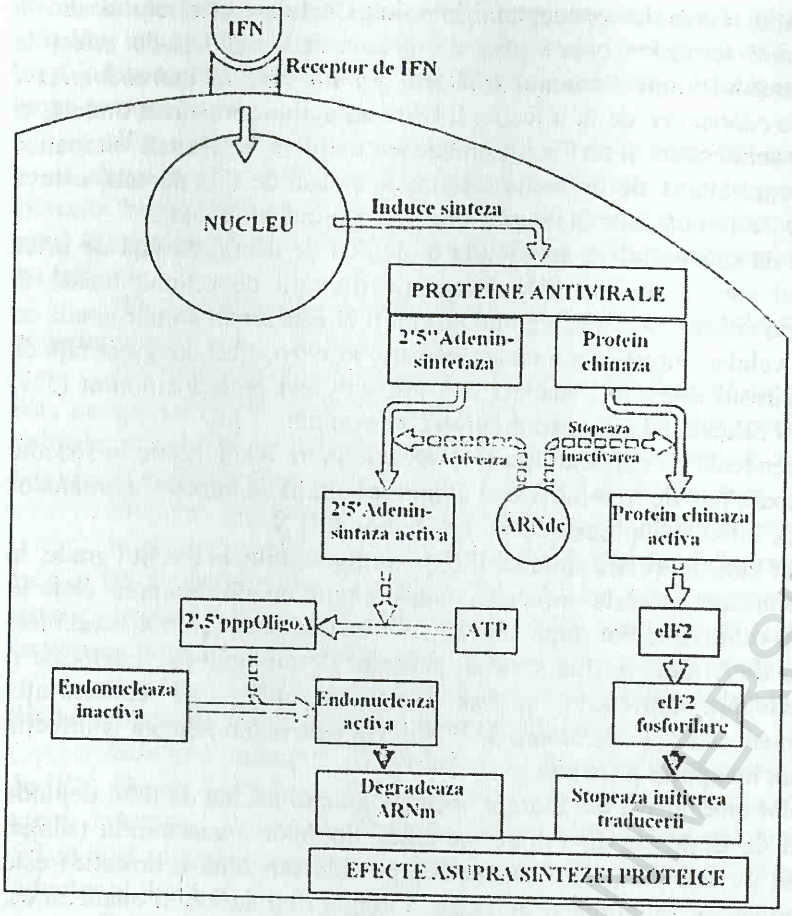


Fig. 439. Mecanismele acţiunii antivirale ale *interferonilor*. Interferonii se leagă specific de receptorii de IFN şi produc numeroase efecte, două dintre ele fiind illustrate în schemă. IFN induc sinteza proteinelor antivirale – *2',5' adenozin-sintaza* şi o *protein-kinază*. Ambele sunt activate de ARN dublu catenar, intermediarul replicării genomului viral ARN. Sintaza induce formarea 2',5' ppp-oligo A, care activează o endonuclează capabilă să producă degradarea ARNm. Protein-kinaza fosforilează factorul de iniţiere al sintezei proteinelor, eIF_2, pe care îl inactivează (după Male, 1987).

a) În cele mai multe sisteme virus-celulă, inhibiţia multiplicării virale este rezultatul *interferenţei cu etapa traducerii* ARNm viral. Interferonul inhibă asocierea ribosomilor cu mesagerii virali. De exemplu, în celulele liniei L (originară din fibroblaste de embrion de şoarece), după infecţia cu virus vaccinal, se produce dezagregarea polisomilor celulari. ARNm viral se asociază cu ribosomii eliberaţi şi formează polisomi ce sintetizează proteine specific virale. In celulele tratate cu IFN, înainte de infecţia virală, *ARNm viral nu se asociază cu ribosomii*, nu se sintetizează proteine şi infecţia este abortivă. Efectul este acelaşi după infecţia cu reo-, picorna-, toga-, rhabdo-, paramixo-, herpes- sau cu papovavirusuri.

În celulele tratate cu actinomicina D (un inhibitor specific al sintezei proteice), efectul protector al IFN nu se realizează.

b) În celulele infectate, IFN induce sinteza unor proteine cu efecte antivirale:

- *protein-kinaza dependentă de ARN dublu catenar (PKR)*, denumită şi kinaza factorului de iniţiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2), inhibitoare a traducerii ARNm viral;
- sistemul *2',5'-oligoadenilat sintetaza/RN-aza L;*
- *adenozin-dezaminaza specifică pentru ARN (ADAR);*
- *produsul genei 56;*
- *proteinele Mx.*

PKR, ADAR, sistemul 2-5-OAS/RN-aza L sunt exprimate constitutiv în celulele normale, în formă latentă inactivă. Nivelul minimal al ARNm al acestor enzime este stimulat de IFNα/β. Enzimele sunt activate de ARNdc.

PKR (67 kDa) este o kinază serină/treonină celulară şi în mod normal se sintetizează cu o rată foarte scăzută. Enzima, în proporţie de 80% are sediul citoplasmatic (restul de 20% este nucleară, asociată în primul rând cu nucleolul), este asociată cu ribosomii şi este mai fosforilată decât cea nucleară. PKR are rol esenţial în răspunsul citoplasmatic la ARN dc.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PKR nefosforilată este inactivă, dar se activează prin *autofosforilare*[*], proces mediat de ARN dc.

[*] Celulele își reglează activitatea prin fosforilarea enzimelor și a altor enzime. Fosforilarea are avantajul că este rapidă, nu necesită sinteza sau degradarea proteinelor pentru a schimba activitatea metabolică a celulei. Efectul este reversat sub acțiunea protein-fosfatazelor, care scot grupul fosfat. Multe enzime se activează prin fosforilare și se inactivează prin defosforilare. Proteinele pot fi fosforilate la tirozină, serină, treonină sau la histidină. Fiecare dintre acestea necesită o clasă de kinaze. Pentru semnalizarea în SI sunt relevante fosforilările tirozinei și serinei.

În celulele tratate cu IFN, nivelul PKR crește de peste 20 de ori. Enzima este mediatoare a efectelor antiproliferative și antivirale produse de IFN.

Activarea PKR influențează transcrierea și traducerea: în celula infectată cu un virus, PKR se asociază cu ARN dc și se autofosforilează. PKR are două domenii de legare cu ARN și un domeniu kinazic. Este activată de concentrațiile mici de ARN dc, dar este inhibată de concentrațiile mari. *In vitro*, ARN activator al PKR are o lungime de 33-80 pb.

PKR activată poate fosforila câteva substraturi celulare, fiind una dintre cele 4 kinaze mamaliene ce fosforilează *factorul 2α de inițiere a sintezei proteinelor la eucariote* (eIF-2 α), ca răspuns la semnalele de stres, în special infecția virală (Garcia, 2006). eIF-2 α fosforilat la resturile de serină și treonină nu poate fi reciclat pentru inițierea traducerii și astfel sinteza proteinelor celulare este inhibată. PKR nu inhibă traducerea moleculelor de ARNm celulare și virale care au particularități ale secvenței 5' netraduse. La nivel celular, PKR are efect antiproliferativ, iar la nivelul organismului, PKR are efect antitumoral esențial. Punctul de convergență al celor două efecte constă în efectul apoptotic al activării PKR.

O altă cale activată de ARN dublu catenar și de IFN este cea mediată de acțiunea cooperantă a *2',5'-oligo-adenilat- sintetazei (OAS) și a RN-azei L*. Interferonii induc sinteza unei familii de enzime denumite *2-5-adenilat-sintetaze*, care polimerizează ATP în oligo-adenilați de diferite lungimi, legați 2'–5'. Aceste enzime sunt inactive, dar se activează datorită unei schimbări conformaționale care se produce consecutiv legării cu ARN dublu catenar. 2',5'-AS activată este capabilă să polimerizeze nucleotide rezultate din ATP și alte nucleotide în legături 2'–5'. In molecula de 2',5'-oligoadenozină, resturile de riboză sunt legate prin punți fosfo-diesterice 2'–5'. Acestea sunt legături unice, deoarece toate polinucleotidele naturale conțin legături 3'–5'.

Unica funcție a *2',5'-oligoadenozinei* este activarea *RN-azei L*. RN-aza L este sintetizată constitutiv și detectabilă în toate celulele animale. Majoritatea celulelor conțin o *fosfodiesterază* ce hidrolizează oligoadenilații 2',5' și atenuează răspunsul 2-5A.

Oligomerul 2,5 A catalizează trecerea *RN-azei L* din forma monomerică, inactivă, în forma dimerică activă. *RN-aza L dimerică* dobândește activitate catalitică *endoribonucleazică*. Ea poate cliva ARN celular și viral monocatenar, inclusiv ARNr 18S, 28S și ARNm la secvențe specifice, inhibând sinteza proteinelor. RN-aza L activată poate să inducă apoptoza.

Sinteza ADAR este indusă de IFN. ARN viral și celular este modificat post-transcriere: *adenozin-dezaminaza specifică pentru ARN (ADAR)* îl modifică prin dezaminarea adenozinei. Este o enzimă importantă pentru *ARN-editing*[*].

[*] ARN-editing semnifică totalitatea modificărilor ARN rezultat prin transcrierea genelor continui și care se fac prin adiție de nucleotide fără matriță, prin deleție, substituție sau conversie.

Dezaminarea *A* are importanță biologică majoră. Conversia *A* la *I* (Inozină) modifică mesajul ARN[*], deoarece *I* este recunoscută ca *G* (nu ca A). Molecula de ARN astfel modificată este tradusă într-o proteină a cărei secvență de aminoacizi diferă față de a proteinei native.

[*] Modificarea extensivă s-a descris inițial pentru ARNm al proteinei M (matrix) a virusului rujeolic de la pacienții cu PESS. Pentru virusurile cu genom ARN de polaritate negativă, *hipermutația datorată dezaminării A* este asociată cu *persistența* infecției. Pentru virusurile cu genom ADN dc, modificarea reprezintă un mecanism prin care copiile de ARNm timpuriu sunt inactivate.

În contrast cu modificarea frecventă A – I la unele virusuri ARN, există câteva cazuri de ARN viral și celular la care conversia A – I catalizată de ADAR are loc cu selectivitate înaltă, la poziții specifice ale A. De exemplu, la HDV, ARN editing are rol esențial pentru sinteza a 2 proteine cu funcții diferite, de la un ORF: sinteza formei a a AgD se face după conversia selectivă a codonului terminal amber UAG, la codonul Trp UIG.

ADAR este o enzimă de 150 kDa, ce acționează asupra ARN, cu localizare în primul rând nucleară, dar și în citoplasmă. Datorită localizării citoplasmatice și capacității de a recunoaște și de a dezamina ARN dc, s-a sugerat că ADAR-L poate avea rol în apărarea față de virusurile care se multiplică în citoplasmă.

Proteina 56 (p56) se leagă de factorul de inițiere 3e al celulei eucariote (eIF3e), subunitate a eIF3 și funcționează ca inhibitor al inițierii traducerii ARNm.

Proteinele Mx din familia GTP-azelor sunt mediatorii rezistenței genetice a șoarecelui la virusul gripal, acționează probabil prin înfășurarea în jurul nucleocapsidei virale și împiedică polimeraza virală să continue transcrierea catenei.

Strategii virale pentru contracararea mecanismelor de apărare ale gazdei. Pentru că strategia majoră de răspuns al celulei la infecția virală este creșterea concentrației de PKR, cele mai multe virusuri sintetizează proteine care degradează PKR, inhibă interacțiunea PKR cu ARN dc sau inhibă activitatea kinazei, prin interacțiune directă cu PKR blocând astfel autofosforilarea și activarea ei.

La virusurile cu genom ARN mc, intermediarii de replicare sunt molecule de ARN dc, evidențiate în citoplasma celulelor infectate cu virusul rubeolei și SFV. La virusurile cu genom ARN dc, chiar genomul este sursa ARN dc. Pentru cele mai multe virusuri, inductorul expresiei genelor pentru sinteza IFN α/β este ARN dc. Multe virusuri ARN dc au elaborat strategii care previn expunerea ARN dc în citoplasma celulei. La reovirusuri, genomul ARN dc rămâne în interiorul capsidei tot timpul ciclului viral. ARN mc de polaritate pozitivă este împachetat în particulele subvirale și numai după aceea este sintetizată cea de a II-a catenă. Deoarece ARN dc are capacitatea potențială de a induce un răspuns antiviral, cei mai mulți intermediari ai replicării genomului ARN se găsesc *în asociație cu proteinele virale*, care maschează regiunile dublu catenare ale ARN viral. Pe de altă parte, ribonucleoproteinele virale sunt expuse catabolismului celular, care eliberează catenele ARN pozitive de cele negative. De aceea, în ciclul multiplicării virale, este expusă o cantitate foarte mică de ARN dc. ARN dc este, în esență, un produs minor al ciclului de multiplicare virală.

Alte activități biologice. IFN α/β stimulează expresia moleculelor CMH I, dar numai IFN γ stimulează expresia moleculelor CMH II (fig. 440). Creșterea nivelului lor se crede că mărește eficiența RIMC.

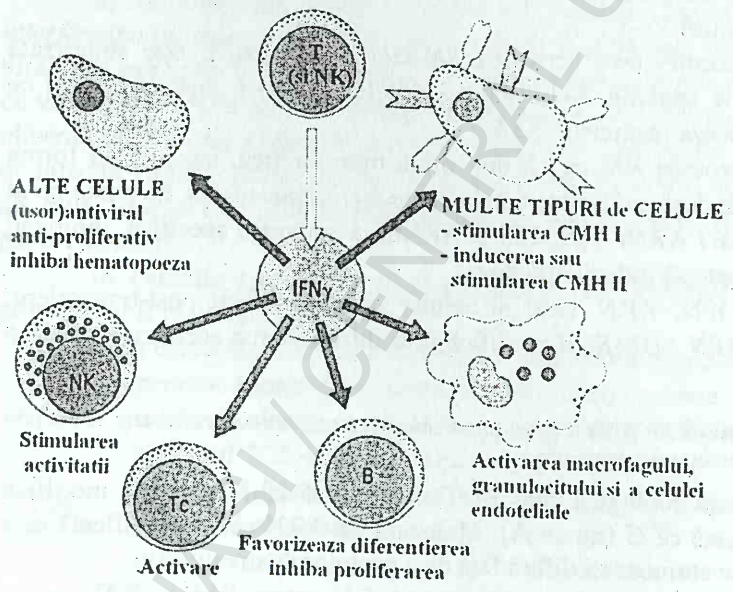


Fig. 440. Funcțiile IFNγ sunt multiple: activitățile antivirală și antiproliferativă sunt mai puțin intense decât ale IFNα și IFNβ, dar este inductor mai puternic al activării moleculelor CMH clasa II pe celulele tisulare, fiind sinergic cu TNFα și TNFβ (după Roitt, 1998).

IFN influențează prelucrarea și prezentarea peptidelor antigenice, modulând expresia componentelor celulare ale proteasomilor ce generează peptide și a componentelor celulare care orientează peptidele pentru interacția cu moleculele CMH I.

Interferonii au acțiune directă, prin inducerea modificărilor în membrana plasmatică a celulei, mărind rigiditatea stratului lipidic. Acesta poate fi mecanismul efectului inhibitor al IFN asupra transformării maligne a celulelor, sub acțiunea virusurilor oncogene.

Interferonii sunt inductori ai enzimei nitric-oxid-sintetază (NOSi), care prin oxidul nitric (NO) inhibă multiplicarea virusurilor în anumite celule. NOSi este implicată în funcţia macrofagelor activate şi în patogeneza maladiilor inflamatorii şi autoimune. IFN γ este activator al macrofagului, iar NO este un efector important al mecanismelor sale antimicrobiene. Unele efecte citotoxice ale NO se datorează reactivităţii cu Fe din enzimele mitocondriale şi inhibă transportul electronilor pe catena de respiraţie.

IFN inhibă nu numai multiplicarea virusurilor, ci şi creşterea şi multiplicarea microorganismelor parazite intracelulare, unele activităţi metabolice tisulare (de exemplu, pentru că inhibă sinteza proteică, IFN poate să inducă procese de necroză celulară). IFN inhibă multiplicarea celulelor tumorale, creşterea şi diviziunea celulelor normale, reacţiile de hipersensibilitate întârziată. IFNα are proprietăţi antiproliferative şi se foloseşte în tratamentul unor neoplazii (sarcomul Kaposi, leucemia păroasă, melanom, negi genitali). Tumorile originare în limfocitele B sau în celulele plasmocitare sunt cele mai sensibile. IFNγ este activ în maladia Hodgkin (proliferarea malignă a limfocitelor B ganglionare) şi în CGD (boala cronică granulomatoasă). Cel mai mare succes terapeutic al IFN a fost în tratamentul leucemiei 'păroase' (*hairy cell*), denumită astfel după aspectul spinos al suprafeţei celulei.

IFNα, uman recombinant, singurul disponibil comercial, se utilizează pe scară largă în *tratamentul infecţiilor virale*: cu virus rabic, virusuri encefalitogene, CMV, VHB, VHC. Nu se absorb din tractul gastro-intestinal şi de aceea se administrează prin injectare im sau sc. In sânge, timpul de înjumătăţire este scurt, dar starea antivirală poate dura câteva zile. Efectul lor este ameliorarea sau chiar eliminarea infecţiilor persistente. 50% dintre pacienţii cu VHC răspund prin ameliorarea funcţiilor hepatice, a inflamaţiei hepatice şi a nivelului ARN viral în ser, iar la 20% dintre ei, infecţia este eliminată.

IFN sunt activi numai dacă se administrează timpuriu în evoluţia infecţiei, când sistemul imunitar este intact funcţional. IFN nu traversează bariera placentară.

Administrarea IFN produce efecte benefice sau poate să se transforme într-o furtună a citokinelor cu efecte sistemice: inflamaţie, febră, dureri de cap, mialgie, artralgie, anemie, senzaţie de oboseală sau de rău general (o stare 'influenza-like'). Toleranţa se instalează curând şi terapia poate continua. La 2–3% dintre cei trataţi, se sintetizează anticorpi specifici.

Pacienţii cu maladii autoimune au nivele crescute de IFN produs de celulele dendritice plasmocitoide (CDp) stimulate de ADN şi de snRNA (small nuclear). Administrarea IFN în scop terapeutic poate agrava maladia autoimună.

Efectele *stimulatoare* ale IFN se exercită asupra nivelului de exprimare a unor molecule de suprafaţă a celulelor (de exemplu, moleculele CMH, receptorii de mare afinitate pentru regiunea Fcγ ai macrofagului, cu consecinţe importante pentru rata eliminării complexelor imune prin fagocitoză şi asupra fenomenului ADCC).

Interferonii au proprietăţi imunomodulatoare: stimulează activitatea citotoxică a *limfocitelor NK* şi activează metabolismul oxidativ al macrofagelor, precum şi activitatea lor antitumorală. Pe suprafaţa limfocitelor T, IFN stimulează expresia receptorilor pentru IL-2 şi implicit răspunsul imun, dacă este administrat concomitent cu antigenul. Efectul imunostimulator al IFNα se poate atribui unei mai bune exprimări a moleculelor CMH pe celulele accesorii ale RI, ceea ce condiţionează o prezentare mai eficientă a antigenului.

Semnificaţia biologică. IFN sunt componente ale reţelei citokinelor. Citokinele sunt molecule active, produse de diferite categorii de celule, sub acţiunea unor stimuli, inclusiv sub acţiunea IFN.

Citokinele interacţionează cu receptorii altor celule şi reglează procesele lor de proliferare şi diferenţiere. Deoarece limfocitele stimulate produc IFNγ, interferonii fac parte din categoria limfokinelor.

Producerea IFN. In unele celule, sinteza IFN este indusă spontan, în absenţa unui inductor detectabil. IFN α şi γ sunt produşi de liniile celulare limfoblastice originare în celulele T, în concentraţii variabile, de la 1 la 1000 U/ml.

Interferonii sunt produşi prin tehnologia *ADN recombinant*, în celule manipulate genetic. Genele codificatoare ale sintezei IFN au fost izolate, secvenţiate şi inserate în vectori de clonare. Aceştia au fost transferaţi în celula procariotă (*E. coli*) sau eucariotă. Genele codificatoare ale IFN sunt funcţionale atât în celule bacteriene, cât şi în celule de levuri şi de mamifere. Pe această cale, *in vitro*, sau obţinut cantităţi mari de IFN (utilizabili în clinică).

Bibliografie

Samuel C. E. 2001. *Antiviral Actions of Interferons*. Clin. Micr. Rev vol. 14, no. 4, pp. 778–809.

Kumar M., Carmichel G. G. 1998. Antisense RNA : Function and Fate of Duplex RNA in Cells of Higher Eukaryotes – Micr. and Mol. Biol. Rev. vol. 62, no. 4, p. 1415 – 1434.

Farrar M. A., Schereiber R. D. 1994. The Molecular Cell Biology of Interferon-gama and its Receptor. Annu. Rev. Immunol., 12: 517–611.

Vilcek J., Sen G. C. 1996. Interferons and other Cytokines, în vol. Fields Virology, Third Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincot – Raven Publishers, Philadelphia.

Joklik W. K. 1985. Interferons, în vol. Virology, ed. by B. N. Fields et al., Raven Press, New York.

Joklik W. K. 1991. Interferons, în vol. Fundamental Virology, second Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press Ltd. New York, 1991.

Whitton L. J., Oldstone M.B.A. 1996. Interferons, în vol. Fields Virology, Third Ed., ed. by B. N Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincot- Raven Publishers, Philadelphia.

Bluyssen H. A. R. 1998. Interferon alpha, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. 1997. Cellular Responses to Interferon gama – Annu. Rev. Immunol. 15: 749–795.

Vilcek J. 1998. Interferon gama, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Garcia M. A., Gil J., Ventoso I., Guerra S., Domingo E., Rivas C., Esteban M. Impact of Protein kinase PKR in Cell Biology: from Antiviral to Antiproliferative Action – MMBR, 70(4): 1032–1060.

22.2. Răspunsul imun antiviral specific (adaptativ)

Mecanismele de apărare nespecifică (IFN, acțiunea celulelor NK, răspunsul mucociliar) influențează evoluția infecției. Majoritatea infecțiilor respiratorii și enterice sunt inaparente (subclinice) și această modalitate de evoluție se datorează eficienței mecanismelor de apărare nespecifică. Dacă barierele imunității nespecifice sunt depășite, infecția evoluează în forma clinică și activează răspunsul imun specific.

Proteinele virale, componente ale capsidei și peplosului, sunt imunogene și induc un răspuns imun intens în organismul gazdă. Răspunsul imun antiviral este orientat atât față de antigenele exprimate pe suprafața virionilor, cât și față de antigenele prezentate pe suprafața celulei infectate.

Antigenele expuse pe suprafața celulei infectate, diferă în funcție de natura virusului (nud sau învelit) și de mecanismul maturării virionilor. Celulele infectate cu virusuri nude (adeno-, reo-, entero-) expun pe suprafața lor proteine virale asociate cu moleculele CMH I, iar cele infectate cu virusuri învelite, în special cu virusuri care se maturează prin înmugurire la nivelul membranei, expun glicoproteinele peplosului, inserate în arii limitate ale membranei. În ambele cazuri, celula infectată devine ținta mecanismelor de recunoaștere imunitară.

Antigenele expuse pe suprafața virionului sau a celulei infectate, stimulatoare ale răspunsului imun, se numesc *antigene protectoare*. Antigenele intrinseci ale virionului au rol protector nesemnificativ, deoarece nu vin în contact cu sistemul imunitar, decât în cazul în care se sintetizează în exces și se elimină din celula infectată.

Activarea coordonată a celor două compartimente ale RI este esențială pentru controlul și eradicarea infecției virale, care necesită eliminarea eficientă atât a virusului din spațiul extracelular, cât și a celulelor infectate.

În unele infecții, în faza intracelulară a multiplicării virale, RI este dominat de setul de limfocite Th_1 (activatoare ale IMC), iar ulterior, după eliberarea virionilor progeni, RI dominat de setul Th_2 (activatoare ale IMH), este mai adecvat pentru apărarea gazdei. Antigenele virale libere sau asociate virionului, stimulează *răspunsul imun humoral*, iar cele prezentate pe suprafața celulelor infectate, stimulează IMC.

Activarea unuia sau altuia dintre compartimentele imunității, depinde de mai mulți factori: de tipul infecției (primară sau secundară), de rezultatul interacțiunii virus-celulă (liză sau infecție persistentă) etc.

Virusurile care produc *infecții acute*, induc o competiție între multiplicarea virală și efectorii răspunsului imun. Rezultatul este însănătoșirea sau moartea gazdei.

Pentru virusurile care produc *infecții cronice*, scara de timp a interacțiunii este mai lungă. Majoritatea manifestărilor clinice care însoțesc infecțiile virale cronice, sunt consecința răspunsului

imun al gazdei, stimulat de antigenele virale. Virionii sau antigenele virale din sânge sau din alte fluide formează cu anticorpii, complexe Ag-Ac, cu manifestări patologice secundare. Alteori, anticorpii antivirali şi celulele T activate, pot produce leziuni ale celulelor infectate.

22.2.1. Imunitatea mediată humoral

După infecţia *virală primară* sau după administrarea *vaccinului inactivat*, se stimulează răspunsul humoral (fig. 441) şi IMC citotoxic.

Răspunsul imun humoral faţă de antigenele virale parcurge etapele descrise anterior, dar prezintă anumite particularităţi, ca o consecinţă a naturii acestor entităţi infecţioase. Virusurile pătrund în organism, la nivelul mucoaselor şi prin leziunile tegumentare.

Receptorii imunoglobulinici ai limfocitelor B recunosc Ag virale în formă nativă sau sub forma proteinelor solubile secretate de celulele infectate.

Virusul infectant înglobat de limfocitul B şi de CD, este prelucrat proteolitic în compartimentul endocitar acid, iar peptidele antigenice sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH II. Pe suprafaţa CPA, epitopii virali sunt recunoscuţi de limfocitele TCD_4. Acestea au, în esenţă, funcţie reglatoare prin setul de limfokine pe care le secretă şi modulează în special, răspunsul specfic al limfocitelor B faţă de Ag viral şi în măsură mai mică, răspunsul limfocitelor T.

Celulele dendritice (derivate din celule precursoare din măduva osoasă) sunt foarte numeroase la porţile de intrare a virusurilor, dar sunt imature: preiau antigenul viral, dar nu pot să-l prezinte celulelor T neinformate, pentru că moleculele CMH II membranare au o densitate mică şi lipsesc moleculele co-stimulatoare. CD au însă receptori pentru chemokine (mediatori ai deplasării orientate), ceea ce duce la recrutarea lor în situsurile inflamatorii.

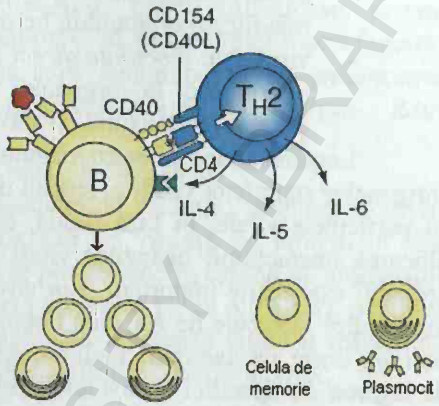


Fig. 441. Răspunsul imun antiviral mediat humoral. Virusul este recunoscut de Ig de suprafaţă a limfocitelor B, internalizat şi prelucrat. Peptidele virale se asociază cu moleculele CMH II şi sunt expuse pe suprafaţa limfocitului B. Complexul peptid-CMH II este recunoscut de celula TCD_4. Pentru eliberarea semnalului activator este necesară interacţia ligandului CD_{40} al celulei CD_4, cu receptorul pentru ligandul CD_{40} al limfocitului B. Limfocitul T eliberează citokine (IL-4, 5, 6), activatoare ale celulei B. Celula B răspunde prin proliferare şi generează două categorii de celule: de memorie şi plasmocite (după Neurath, 2009).

Sub acţiunea stimulatoare a antigenelor invadante, CD se maturează. Capacitatea lor de a endocita antigenele creşte în perioada de maturare, apoi scade treptat. CD internalizează antigenele prin fagocitoză, EMR sau prin pinocitoză. Unele virusuri infectează CD, iar paramixovirusurile pătrund în CD prin fuziunea peplosului cu membrana citoplasmatică. Cele mai multe virusuri nu infectează direct CD, dar virionii eliberaţi în ciclul de multiplicare şi antigenele moleculare sunt preluate, prelucrate şi prezentate de CD activate.

CD expun Ag virale solubile în asociaţie cu moleculele CMH I şi II. Pe această cale, virusurile care nu pot infecta CD stimulează un RI eficient, prin activarea celulelor TCD_8 specifice neinformate.

Celulele dendritice de tip 1 (mieloid) secretă IL-12 şi stimulează răspunsul Th1 (IMC), iar CD de tip 2 (plasmocitoid) secretă cantităţi mici de IL-12 şi stimulează răspunsul imun de tip Th2 (IMH), cu activarea celulelor B şi a macrofagelor.

Cea mai mare parte a Ig se sintetizează în MALT, predominant la nivelul intestinului, mai mult decât în măduva osoasă, sub forma IgA, deoarece suprafaţa mucoasei este poarta de intrare a multor agenţi infecţioşi.

Răspunsul *humoral* are o dinamică lentă şi constă în sinteza IgM, IgA şi IgG. În stadiul acut al infecţiei, titrul Ac specifici este abia detectabil, dar atinge valoarea maximă la 2–4 săptămâni şi persistă săptămâni sau luni, în funcţie de gazdă, virus etc. Pentru virusul febrei galbene şi cel rujeolic, nivelul detectabil al Ac persistă tot restul vieţii.

Rolul protector al Ig este variabil de la un virus la altul, în funcţie de sediul multiplicării, care la rândul său condiţionează manifestările patologice ale infecţiei.

CAROL DAVILA UNIVERSITY LIBRARY

În funcție de mecanismul patogenezei, se disting trei tipuri de virusuri:

- virusurile care infectează *mucoasele tractului respirator și digestiv* și rămân la poarta de intrare: rhinovirusuri, influenza, parainfluenza, virusul respirator sincițial, enterovirusuri;
- virusuri care infectează și se multiplică în celulele *mucoaselor*, iar ulterior se *disemineză* pe cale sanguină, limfatică sau axonală, pentru a infecta viscerele sau SNC: virusul polio, rujeolic, al oreionului, herpes simplex, pox, virusul hepatitei A;
- virusurile *inoculate direct în sânge*, prin mușcătură, înțepătură, prin traume, iar de aici se răspândesc la organele țintă: HIV, virusul hepatitei B, virusul rabic, virusurile encefalitogene (alfa- și flavivirusuri).

Legarea anticorpilor cu virionul se face după modelul complementarității spațiale între epitopii antigenelor suprafeței virale și situsul de combinare al anticorpilor. Efectul principal al interacțiunii Ac cu particulele virale, în faza fluidă, este *neutralizarea*, adică pierderea infecțiozității virionilor, prin blocarea interacțiunii liganzilor virali cu receptorii celulari. Fenomenul s-a demonstrat *in vitro*, dar probabil este foarte important și *in vivo*. Pentru producerea efectului neutralizant este necesară legarea mai multor molecule de Ac, care trebuie să recunoască o structură esențială a virionului, denumită *situs (epitop) critic*. De exemplu, fagii din seria T-par au un singur situs critic și infecțiozitatea lor este anulată de legarea Ac specifici la nivelul fibrelor cozii. Pentru virionul gripal, anticorpii anti-HA sunt neutralizanți, cei specifici anti-NA au efect neutralizant minim, iar Ac anti-proteină M sunt total ineficienți.

La adenovirusuri, situsurile critice sunt *capsomerele hexonice și fibra pentonică*. Anticorpii specifici față de aceste structuri sunt neutralizanți, iar Ac anti-penton nu diminuează infecțiozitatea. Pentru HIV, situsul critic este *glicoproteina 120*, prin care virionul se atașează de moleculele CD_4 ale limfocitului Th. Anticorpii specifici față de liganzii peplosului virionilor herpetici au efect neutralizant.

Anticorpii specifici interacționează cu Ag virale extracelulare, dar nu implică virusul intracelular. Fixarea Ac pe antigenele virale expuse pe suprafața celulei infectate poate preveni eliberarea virionilor. Activarea cascadei C produce liza celulei infectate (*citoliza*).

Anticorpii necitolitici pot masca antigenele virale expuse la suprafața celulei, devenind astfel inaccesibile celulelor efectoare litice (limfocite Tc, NK).

Proteinele complementului pot acoperi virionii înveliți, tapetați cu Ac și se produce liza. Retravirusurile sunt lizate de C, chiar în absența anticorpilor. Complementul pare să aibă rol în faza timpurie a infecției, când Ac au afinitate mică și titrul scăzut. Proteinele C sunt importante ca mecanism efector humoral față de infecțiile bacteriene, dar rezistența celor cu deficit al C, față de infecțiile virale este normală.

Anticorpii antivirali sintetizați în cursul RIP au specificități multiple, au energie mică (afinitate) de legare cu situsurile antigenice ale virionilor și se disociază ușor, lăsând o infecțiozitate reziduală. Alteori, moleculele de anticorpi nu acoperă situsurile critice ale virionilor și nu sunt neutralizanți. Ac neutralizanți se sintetizează mai târziu și sunt esențiali pentru protecția față de reinfecția cu virusul omolog.

Anticorpii antivirali contribuie la eliminarea virusului (clearance) prin blocarea interacțiunii cu celulele sensibile, iar complexele Ag-Ac-C sunt epurate de celulele fagocitare. Regiunea Fc a Ac este recunoscută de fagocite și astfel este accelerată eliminarea Ag virale din mediul intern. Nu numai proteinele structurale ale virusului induc un RI protector: proteinele NS ale flavivirusurilor stimulează RI protector față de virusul febrei galbene, denga, virusul encefalitei transmisă de căpușe.

Anticorpii au o contribuție esențială la încheierea proceselor infecțioase cu *fază viremică* deoarece *reduc încărcătura de virus în sânge* și diminuează infecțiozitatea. Consecința este scăderea numărului de celule infectate și ușurarea sarcinii celulelor T citotoxice. La om, IMH față de infecțiile virale sistemice poate dura câteva decade, având rol important în prevenirea reinfecției și în protecția nou-născutului. Menținerea nivelului seric înalt de Ac se numește *memorie serologică*. Timpul de înjumătățire al Ig serice este de 7–21 zile. Menținerea pe termen lung a titrului crescut al Ac serici necesită sinteza continuă a acestor molecule, chiar în absența Ag. Celulele B de memorie se activează și se diferențiază în celule plasmatice. Dacă infecția este persistentă, Ag virale recrutează noi celule B.

Celulele infectate cu virusuri pot fi lizate prin *fenomenul ADCC* (*a*ntibody *d*ependent *c*ell *c*itoxicity), prin acțiunea limfocitelor Tc sau NK. Celulele NK și macrofagele ce poartă receptori pentru regiunea Fc, se leagă cu Ac fixați pe suprafața celulei infectate și eliberează enzimele citolitice.

Tapetarea virionului cu Ac nu este totdeauna suficientă pentru efectul neutralizant. Eficiența protectoare a Ac crește odată cu disocierea complexului Ag-Ac de pe suprafața virionului.

Răspunsul imun este considerat ca un factor de selecție negativă a agenților patogeni, deoarece teoretic, duce la eliminarea acestora. Dar, uneori, reactivitatea imunitară influențează favorabil multiplicarea patogenului: unele virusuri induc sinteza Ac specifici pentru a dobândi intrarea în celula țintă, lărgind spectrul receptorilor celulari. Complexele virus-Ac-C pot fi infecțioase, deoarece regiunea Fc a Ig se fixează pe receptorul pentru Fc sau pentru C al monocitelor/macrofagelor și granulocitelor. Anticorpii stimulatori ai procesului infecțios sunt denumiți Ac de *enhancement*. Fenomenul s-a demonstrat *in vitro* pentru *Bunya-, Corona-, Flavi-, Ortho-, Paramyxo-, Retra-, Rhabdo- și Togavirusuri*.

În cursul *infecției secundare*, anticorpii se sintetizează rapid, la titru înalt.

Imunopatologie. La pacienții cu infecții persistente asociate cu viremie, anticorpii antivirali pot să producă efecte *patologice* indirecte. Anticorpii se fixează pe virioni, pe proteinele virale solubile din sânge și formează complexe Ag-Ac în exces, care se pot depune în capilarele glomerulilor renali datorită presiunii sanguine de 4 ori mai mare. Este inițiată activarea C, cu eliberarea peptidelor chimiotactic pozitive pentru PMN și monocite. Leucocitele activate eliberează citokine inflamatorii (TNF, IL-1, ROI, enzime lizosomale) ce induc inflamația, rezultatul fiind glomerulonefrita.

22.2.2. Protecția antivirală a mucoaselor

Protecția antivirală a mucoaselor (fig. 442) este dependentă, în primul rând de IgA. Sinteza locală a Ac (în special IgA) după stimularea virală, este relativ independentă de răspunsul imun sistemic și are efect protector, în absența anticorpilor sistemici.

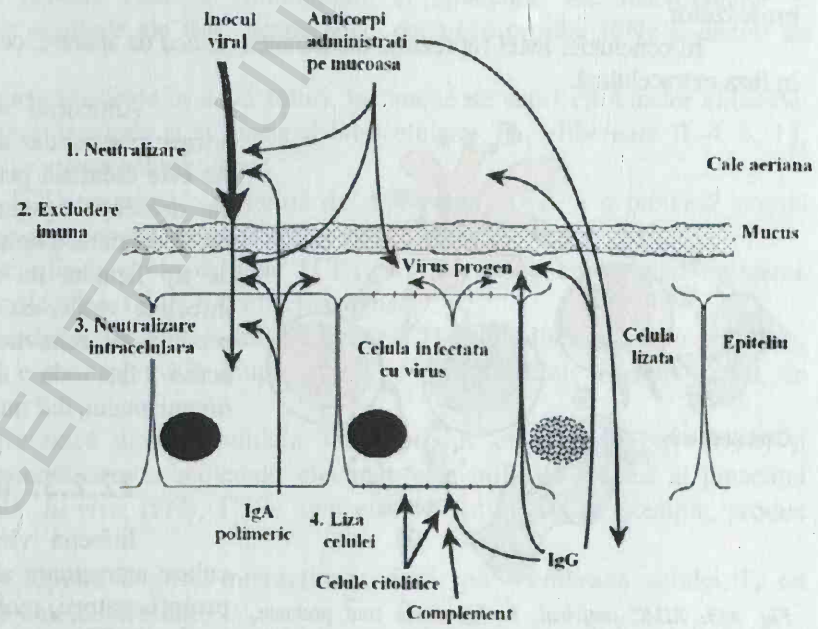


Fig. 442. Mecanismele protectoare ale mucoasei tractului respirator față de infecția virală. După inoculare, particulele virale sunt *neutralizate* (1) de anticorpi, care ajung la suprafața mucoasei prin transport transepitelial (IgA polimeric), prin difuzie (IgG) sau prin administrare artificială (picătură, spray, aerosoli). Alt mecanism este '*excluderea imună*'(2), proces al cărui mecanism constă în legarea virionilor în complexe Ag-Ac și îndepărtarea lor prin activitate mucocilară. Anticorpii pot difuza prin mucus pentru a neutraliza virusul patogen și particulele care trec prin stratul de mucus. Neutralizarea virală poate să se producă *intracelular* (3), în timpul transportului IgA polimeric, așa cum s-a demonstrat experimental pentru virusurile Sendai și influenza *in vitro* cu monostrat de celule epiteliale polarizate. La suprafața bazolaterală a celulelor epiteliale infectate, IgG se poate fixa specific de proteinele membranare codificate de virus și mediază *liza celulei* (4) după fixarea complementului sau prin fenomenul ADCC. Celulele infectate de virus pot fi lizate sub acțiunea limfocitelor Tc specifice. Liza celulelor epiteliale ușurează trecerea efectorilor imunitari în ambele direcții (dupăWeltzin, 1999).

Anticorpii din secrețiile mucoaselor îndeplinesc două funcții majore față de agenții patogeni virali: *excluderea imună și neutralizarea infecțiozității virale*.

Excluderea imună este un mecanism protector foarte important la nivelul mucoasei respiratorii și pare a fi dependent nu numai de imunoglobuline, ci și de stratul de mucus care acoperă epiteliul. sIgA neutralizează infecțiozitatea virionilor prin legarea încrucișată a epitopilor virali, iar *secreția mucoasă* este în primul rând, *o barieră mecanică* ce blochează adsorbția virionilor pe membrana

celulelor epiteliale. După ce sunt sechestrați în stratul de mucus, virionii sunt eliminați spre nazofaringe prin acțiunea mecanică a cililor. Absența activității ciliare este asociată cu infecții severe ale tractului superior, sugerând importanța barierei mucoase.

sIgA are rol esențial în rezistența la reinfecția cu virusurile care se multiplică exclusiv în celulele epiteliale ale mucoaselor digestive și respiratorii. De exemplu, vaccinarea orală cu virus polio inactivat are ca scop stimularea imunității mucoasei. La titru crescut, anticorpii serici (IgM) difuzează în mucoase. Nu se știe în ce măsură anticorpii din secreții sau din sânge protejează epiteliul tractului respirator inferior. În tractul respirator inferior, în secreția mucoasă, se găsesc concentrații mari de IgA și IgG. Anticorpii serici trec în secreții, în mare parte, prin difuzie printre celulele epiteliale.

Deși vaccinurile gripale se administrează parenteral, protecția antiinfecțioasă este conferită de Ac din secreții (sIgA). sIgA conferă o mai bună protecție încrucișată față de variante antigenice rezultate prin drift antigenic, comparativ cu IgG circulant.

Imunizarea pasivă este utilizată în scop profilactic (diminuează riscul infecției virale) și pentru terapia infecțiilor virale stabilizate. Are avantajul că efectul protector este imediat, iar efectele colaterale sunt rare. Administrarea profilactică a Ac este mai eficientă.

Ig folosite pentru imunizare pasivă pot fi *policlonale* sau *monoclonale*, prin administrare im sau iv. Se folosesc Ig anti-VHA, VHB, CMV, rabic, VSR, virusul variolei, rujeolei, rubeolei, parvovirus B_{19}, EBV, HSV, poliovirus, Hantavirus, West Nile, rotavirus, HIV-1, Ebola, SARS-CoV.

Anticorpii administrați prin *imunizare pasivă* ajung în secrețiile tractului respirator și pot să prevină, să diminueze sau să vindece infecțiile virale. Imunizările s-au făcut în special cu IgG pentru că este mai ușor de obținut. IgA are avantajul de a fi polimeric și teoretic, are activitate aglutinantă superioară față de IgG și pentru că nu fixează C, probabil nu stimulează reacțiile inflamatorii. Are o perioadă de activitate mai lungă, deoarece componenta secretoare (CS) îl protejează de acțiunea proteazelor.

În concluzie, IMH reprezintă modalitatea *tactică* de apărare, ce constă în neutralizarea virusurilor în faza extracelulară.

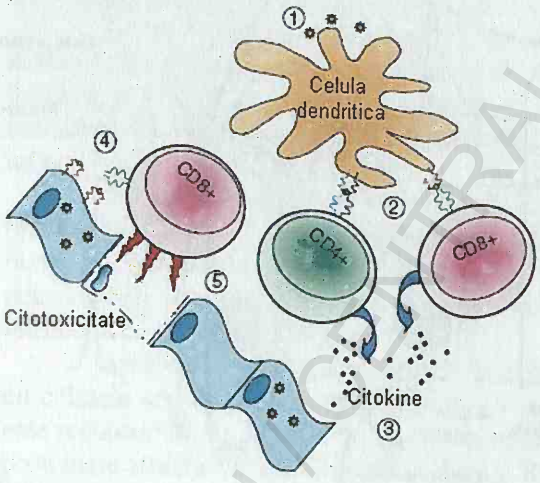


Fig. 443. RIMC antiviral. 1. Ag virale sunt preluate, prelucrate și prezentate de CPA profesioniste (celula dendritică). 2. Complexele CMH-peptid sunt recunoscute de limfocitele TCD_4 și TCD_8. Limfocitele activate secretă citokine stimulatoare ale proliferării și diferențierii în celule efectoare. 3. Celulele TCD_4 eliberează citokine IL-2, IFNγ, TNFα, activatoare ale celulelor TCD_8, dar pot avea și efecte antivirale directe. 4. Celulele TCD_8 activate se dispersează în țesuturi, unde răspund local la situsul infecției virale și (5) exercită efecte citotoxice asupra celulelor infectate. Celulele TCD_4 pot să devină citotoxice, dar impactul lor este mult mai limitat, deoarece recunosc complexele peptid-CMH II, exprimate numai pe CPA profesioniste (după Zajac, 2008).

Anticorpii se sintetizează în răspunsul imun primar și secundar antiviral. Activitatea protectoare a Ac este esențială pentru controlul unor infecții virale, dar neesențială pentru controlul altor infecții primare sau secundare. Copiii cu agamaglobulinemie înnăscută de tip Bruton, nu au sensibilitate crescută față de infecțiile virale, cu excepția meningitei enterovirale, produsă de echovirusurile 9 sau 11. Anticorpii sunt activi față de antigenele virale din umorile organismului, dar nu pătrund în celulele infectate.

22.2.3. Imunitatea mediată celular

Infecția virală declanșează semnale moleculare activatoare ale IMC: sinteza IFN, citokinelor proinflamatorii, mobilizarea CD locale (fig. 443). Se crede că CD sunt predispuse la infecția cu virusuri, ceea ce ușurează funcția lor de senzori ai infecției virale. Chiar dacă nu sunt sensibile la infecție, CD funcționează ca o punte comună, stimulatoare a celulelor CD_8 și CD_4, pe calea clasică a prelucrării Ag exogene.

Imunitatea mediată celular (IMC) constituie mecanismul major al apărării specifice antivirale. Efectorii IMC sunt celulele TCD_8 (citotoxice). Limfocitele T nu recunosc proteinele virale intacte și nu neutralizează virionii.

IMC se activează după mecanismul clasic: Ag virale prelucrate sub forma peptidelor scurte (8–10 aminoacizi) şi prezentate în asociaţie cu moleculele CMH sunt recunoscute specific prin intermediul receptorului de antigen al limfocitelor T.

Orice proteină codificată de virus, structurală sau nestructurală, poate fi prelucrată de *celulele infectate sau de celulele accesorii ale răspunsului imun.*

Fragmentele peptidice derivate după prelucrarea Ag virale sintetizate în interiorul celulei infectate (antigene endogene), sunt prezentate în asociaţie cu *moleculele CMH I.* Aceste molecule furnizează informaţii timpurii despre invazia virală pentru activarea limfocitelor TCD_8, a căror funcţie esenţială este liza timpurie a celulelor infectate. Celulele CD_8 recunosc orice proteină virală, structurală sau nestructurală, asociată cu moleculele CMH şi lizează celulele infectate prin contact direct sub acţiunea factorilor litici sau eliberează citokine ce interferă cu multiplicarea virală.

Recunoaşterea Ag de către celulele T este supusă fenomenului restricţiei CMH*, adică celula T efectoare şi CPA trebuie să aibă molecule CMH identice.

* Numărul lor creşte după infecţia cu influenza, cu virus vaccinal, cu EBV, cu HIV-1. După infecţia cu LCMV, care produce ECP minim, dar stimulează intens IMC, numărul lor creşte de circa 10.000 de ori.

În stadiul timpuriu al infecţiei virale, CD interstiţiale (CDI) de la poarta de intrare a virusului, preiau Ag virale, se activează şi migrează în organele limfoide secundare (OLS): ganglionii limfatici regionali şi splină, unde Ag este prezentat celulelor T neinformate, care circulă în fenomenul normal al imunosupravegherii. Celulele T care recunosc Ag, exprimă molecule de aderenţă, proliferează şi se diferenţiază în celule T efectoare specific-virale.

CD au calitatea dublă, de a prezenta Ag înglobate în asociaţie cu moleculele CMH I şi CMH II.

În OLS, Ag prezentate în asociaţie cu moleculele CMH II sunt recunoscute de *celulele* TCD_4. După activare, *celulele* TCD_4 produc citokine stimulatoare şi atractante ale macrofagelor şi neutrofilelor, efectoare antivirale esenţiale ale IMC nespecifice, deoarece produc IFNγ şi uneori au efect litic asupra celulelor ţintă.

Clasic, celulele TCD_4 sunt clasificate în două seturi, în funcţie de setul citokinelor eliberate: Th_1 stimulatoare ale IMC în infecţiile virale şi cu bacterii intracelulare; Th_2 eliberează IL-4, 5, 13, stimulatoare ale IMH, cu rol în eliminarea helminţilor.

Al III-lea set de celule TCD_4 exprimă o proteină de suprafaţă (CD_{25}) şi o proteină internă ($FoxP_3$), produc citokinele imunosupresoare IL-10 şi TGFβ şi au rol reglator.

În faza iniţială a multor infecţii virale, celulele TCD_8 care au recunoscut epitopul antigenic prezentat de CD în asociaţie cu moleculele CMH I, proliferează masiv.

Din organele limfoide secundare, unde s-au activat, celulele TCD_8 se dispersează în organism, iar la locul infecţiei îşi exercită efectul citotoxic asupra celulelor ţintă, mediat, în primul rând, de *granzime* şi *perforină.*

În afară de acţiunea citotoxică directă, celulele TCD_8 produc citokine (IFNγ, TNFα) şi chemokine. În laborator, evidenţierea acestor molecule efectoare este utilizată ca test al prezenţei celulelor T cu activitate antivirală. *In vivo*, IFNγ, TNFα sunt efectori antivirali: de exemplu, produc moartea hepatocitelor infectate.

Al II-lea mecanism de acţiune implică interacţiunea FasL pe membrana celulei T, cu receptorul pentru Fas pe suprafaţa celulei infectate.

După infecţia primară sau după administrarea vaccinului viral atenuat, răspunsul celulelor Tc are activitate maximă la 7–10 zile şi scade la 2–3 săptămâni după infecţie.

Pentru controlul infecţiei virale, IMC este, uneori, esenţială*.

* In infecţia cu virusul rujeolic, la copiii normali, infecţia produce erupţia tegumentară caracteristică şi ulterior virusul este eliminat. La copiii cu deficienţă a celulelor T, infecţia este adeseori fatală. Manifestările eruptive sunt mediate de celulele T şi la copiii imunosupresaţi nu se produc. Apariţia erupţiei este indicatorul evoluţiei favorabile. La copiii agamaglobulinemici, erupţia se produce şi evoluţia infecţiei este nealterată de absenţa anticorpilor. Se instalează imunitatea de memorie.

La pacienţii cu sindrom Di George (cu aplazie timică congenitală), la pacienţii SIDA, la cei leucemici sau la cei supuşi terapiei imunosupresoare prelungite, frecvenţa şi severitatea infecţiilor virale cresc semnificativ.

IMC precede sinteza anticorpilor în toate infecțiile virale, dar în special în cazul *infecțiilor citolitice* în cursul cărora virusul se multiplică rapid. IMC are rol important în apărarea față de *infecțiile virale primare*, deoarece se activează într-un timp scurt și răspunde nevoilor de *apărare rapidă*, înainte de edificarea RIMH. În focarul inflamator indus de infecția virală se acumulează celule efectoare ale IMC, care ating *valoarea maximă la două zile* de la începutul multiplicării virale.

IMC se activează după ce virusul a pătruns în celulă și aceasta expune pe suprafața ei, antigene virale. Efectul este *liza* celulelor infectate și are rolul de a limita diseminarea virusului în mediul extracelular. Liza celulelor infectate cu virusuri citocide este protectoare numai dacă se produce rapid, înainte de asamblarea virionilor progeni. Liza tardivă are efect opus, deoarece favorizează diseminarea virusului. Pentru virusurile care produc infecții persistente, citoliza, timpurie sau tardivă, are efect protector.

IMC constituie modalitatea *strategică* de protecție antivirală, al cărei efect este liza celulei înainte de încheierea ciclului de multiplicare virală.

Limfocitele Tc activate sunt *specifice* față de virusul infectant. De exemplu, limfocitele Tc sensibilizate față de virusul variolei, lizează numai celulele infectate cu acest virus. Nu lizează celulele normale și nici, *in vitro*, celule alogenice infectate cu același virus.

În infecția *secundară*, răspunsul celulelor Tc este rapid, mediat de celulele Tc de memorie. Celulele de memorie pot să persiste în absența antigenului specific, probabil datorită stimulării sporadice nespecifice, de citokinele eliberate local în timpul reacțiilor față de antigenele neînrudite.

Dacă răspunsul imun adaptativ nu neutralizează agentul infecțios, infecția devine cronică sau latentă.

Imunopatologie. Virusurile, prin natura parazitismului lor, produc de cele mai multe ori, moartea celulelor infectate, asociată cu disfuncția țesutului lezat. Uneori însă, celulele nu mor din cauza virusului infectant, ci ca rezultat al RI antiviral. În unele infecții, în special al celor necitopatice, leziunile tisulare nu sunt cauzate de multiplicarea virusului, ci sunt produse de limfocitele Tc activate. Modelul experimental este LCMV infecțios pentru șoarece, care produce leziuni tisulare minime, dar activează intens IMC. Infecția puilor nou-născuți este ne-citolitică, persistentă, datorată inducerii stării de toleranță. Sistemul imunitar este imatur și nu activează răspunsul limfocitelor Tc. La șoarecele adult, infecția pe cale extranevraxială este asociată cu un proces patologic minim sau chiar absent, pentru că limfocitele Tc elimină celulele infectate cu virus. Inocularea intracerebrală (ic) secundară a animalelor produce o inflamație minimă a meningelui. Inocularea ic la șoarecele neimunizat produce *corio-meningita* (inflamația plexului coroid ventricular, a epiteliului ependimar și a leptomeningei – piamater și arahnoida măduvei). Virusul nu lizează corio-meningele. Moartea animalelor este cauzată de limfocitele Tc anti-LCMV. Șoarecii cu deficit funcținal al celulelor Tc devin purtători cronici de virus, dar leziunile patologice nu apar.

La om, infecția cu VHB are asemănări cu corio-meningita murină: indivizii imunodeficienți devin purtători cronici, maladia nu se manifestă și transmit infecția la persoanele sănătoase. În schimb, ficatul pacienților imunocompetenți, cu hepatită acută și cronică activă, este infiltrat cu un număr mare de limfocite T CD_8.

22.2.4. Mecanisme prin care virusurile evită efectorii răspunsului imun

În mediul extern, virusurile sunt instabile, datorită sensibilității la factorii de mediu. De aceea, pentru a se perpetua într-o populație de organisme sensibile, virusul trebuie să rămână cât mai mult în gazda infectată, ori să se transmită cât mai eficient de la o gazdă la alta. Pe de altă parte, efectorii răspunsului IMH și IMC nu sunt totdeauna eficienți în recunoașterea și eliminarea celulelor infectate cu virus, iar virusul eliberat din celulă trebuie să evite contactul cu efectorii răspunsului imun.

Mascarea epitopilor antigenici. Glicoproteinele învelișului viral sunt glicozilate de aparatul enzimatic al celulei. Astfel, sunt mascați epitopii antigenici ai moleculelor proteice și se evită detectarea lor, diminuând activitatea neutralizantă a Ac.

Cele mai subtile mecanisme de evitare a efectorilor imunitari se găsesc la virusurile care produc *infecții persistente*.

Aproape toate virusurile care *infectează persistent*, exprimă într-o măsură limitată informaţia lor genetică. Celulele infectate *persistent* exprimă o cantitate limitată de antigene virale pe suprafaţa lor, comparativ cu celulele în care ciclul de multiplicare virală este litic. O celulă care expune pe suprafaţa ei un număr mic de situsuri antigenice poate să scape lizei, deoarece situsurile antigenice distanţate nu permit legarea celor două situsuri de combinare ale moleculei de anticorp, necesară activării complementului. Acesta pare a fi mecanismul de supravieţuire a celulelor infectate cu LCMV, cu virusul rujeolei sau cu virusul hepatitei B. În neuroni, HSV exprimă un set restrâns de gene: proteinele virale sunt practic absente, neuronii nu expun Ag virale şi scapă detectării de către efectorii sistemului imunitar, chiar în intervalul în care RI are intensitate maximă. Starea de latenţă a virusurilor herpetice este defavorabilă propagării virusului şi, după ce răspunsul imun se relaxează, virusul se poate reactiva. Latenţa este întreruptă de *infecţia productivă*, timp de câteva zile, în celulele epiteliale permisive. În scurtele perioade de multiplicare sunt produse cantităţi mari virus, care să-i permită diseminarea la alte organisme.

Celulele infectate persistent manifestă fenomenul de *fluctuaţie cantitativă* a antigenului viral, expus pe suprafaţa lor. Celulele infectate cu virusul rujeolic trec succesiv prin cicluri de dispariţie şi reapariţie a antigenelor virale, asociate membranei citoplasmatice, în timp ce moleculele normale ale celulei nu au variaţii cantitative semnificative. Fenomenul se numeşte *modulaţie antigenică.*

Uneori, virusurile persistente infectează ţesuturi cu *statut imunitar privilegiat.* SNC este un astfel de ţesut, deoarece bariera sânge-creier limitează traficul limfocitar, iar neuroniii nu exprimă moleculele CMH I şi II şi după o posibilă infecţie nu pot fi detectaţi de limfocite. Limfocitele T efectoare sau de memorie pot să traverseze bariera sânge-creier, dar nu există semnalele activării unui RI specific anti-viral. De exemplu, virusul rabic, după ce se multiplică în neuroni, parcurge traseul invers prin prelungirile nervoase şi infectează celulele glandelor salivare. Leziunile neuronale sunt asociate cu modificarea comportamentului animalului, care devine agresiv, ceea ce uşurează diseminarea virusului prin muşcătură.

Epiteliile sunt situsuri privilegiate, deoarece sunt protejate de membrana bazală şi sunt greu accesibile efectorilor imunitari – anticorpi şi lifocite T. *Poliomavirusurile BK* şi *JC* persistă în epiteliul calicelor renale, al pelvisului renal, al ureterelor şi vezicii urinare, în prostată, pentru perioade lungi, cu eliberare de virus progen, iar EBV şi CMV persistă în celulele epiteliale ale glandelor salivare.

Papilomavirusurile infectează cheratinocitele şi persistă în ţesutul epitelial al epidermei. Virusul papiloma bovin şi cel uman codifică proteine ce interacţionează direct cu calea endocitară de prelucrare a Ag.

22.2.4.1. Toleranţa şi/sau diminuarea reactivităţii imunitare

Exemplul clasic al inducerii toleranţei este al *virusului corio-meningitei limfocitare* (LCMV), care, la şoarecii infectaţi *in utero, elimină selectiv clonele de limfocite specifice* şi produce o infecţie persistentă cu viremie, pentru tot restul vieţii. *Antigenele virusului hepatitei B* se sintetizează în mare exces şi se elimină din hepatocite, sub forma particulelor fără genom. Excesul cantitativ de antigene virale determină fenomenul de *toleranţă imunitară.* Virusul se transmite prin placentă, când sistemul imunitar este imatur şi fătul devine tolerant la antigenele virale. Se crede că hepatocitele omoară celulele TCD_8 specifice pentru HBV: citokinele inflamatorii pot induce expresia FasL pe hepatocite, iar limfocitele TCD_8 activate exprimă receptorul Fas. Rezultatul interacţiunii poate fi moartea apoptotică a limfocitelor sau a hepatocitelor. Infecţia cu HBV în timpul dezvoltării fetale, produce infecţii persistente productive.

În majoritatea *infecţiilor persistente*, virusurile infectează *celulele sistemului imunitar*: virusul hepatitei B, papovavirus, HSV, virusul Epstein-Barr, CMV, virusurile rubeolei, rujeolei, oreionului, influenza, parainfluenza, HTLV I, II, HIV. Uneori celulele infectate mor, diminuând potenţialul reactiv imunitar.

Adenovirusurile codifică o proteină de 19 kDa (E_{19}), care se asociază cu domeniile α_1, α_2 ale *moleculelor CMH I* şi blochează transportul lor spre suprafaţa celulei, iar două proteine codificate de CMV uman dislocă proteinele CMH I din reticulul endoplasmic, în citoplasmă, unde sunt degradate

rapid. Astfel, celula infectată care nu exprimă molecule CMH I nu este recunoscută de limfocitele T. Proteinele Vpu şi Tat, codificate de lentivirusuri, pot să interfere cu sinteza moleculelor CMH I.

Unele CMV codifică o moleculă omologă cu proteinele CMH I, care intră în competiţie pentru legarea şi prezentarea antigenelor peptidice.

Inhibiţia lizei celulei ţintă mediată de celulele T. Celulele T omoară celulele ţintă, infectate cu virus, prin activarea morţii celulare programate (PCD). Unele proteine codificate de virus blochează PCD şi celula rămâne viabilă, suport al multiplicării virale.

22.2.4.2. Variaţia antigenică

Virusurile, în special cele cu genom ARN, suferă *evenimente mutaţionale* cu o frecvenţă mare, iar în condiţiile presiunii selective de apărare specifică, variantele antigenice apar cu rapiditate. Virusurile care produc infecţii persistente la om (HIV, EBV, VHB, VHC) generează *variante antigenice noi*, care scapă mecanismelor recunoaşterii de către efectorii RI.

Variaţia antigenică constă în faptul că diferitele izolate ale aceluiaşi virus au o reactivitate variabilă cu serul imun standard. Virusul omolog (cel utilizat ca antigen pentru obţinerea serului imun) reacţionează optim cu serul imun standard, dar alte tulpini ale aceluiaşi virus reacţionează diferit, de la un grad înalt până la 0. Lipsa reactivităţii se datorează apariţiei unui alt tip sau subtip antigenic, iar reactivitatea intermediară defineşte grupele antigenice sau serotipurile.

La baza variaţiei antigenice stă selecţia mutantelor virale rezistente la acţiunea Ac. Virusurile cu genom ARN au cea mai înaltă rată a variaţiei antigenice. Mutaţiile nu sunt induse de Ac, dar apar în populaţia virală şi sunt selectate după ce Ac neutralizează virusul de tip sălbatic.

* Rata înaltă a mutaţiei constă în funcţia ARN-polimerazei, lipsită de activitatea de corectare a erorilor (3'proof-reading), astfel că încorporarea unei baze greşite nu este corectată, iar mutantele aleatorii (quasispecii) se găsesc în orice populaţie virală.

Astfel, rhinovirusurile se găsesc în peste 100 de variante antigenice. După infecţie, memoria imună este de scurtă durată, deoarece omul se poate infecta cu oricare dintre cele peste 100 de serotipuri, dacă este expus.

Virusul influenza A evită efectul neutralizant al anticorpilor specifici, prin rata înaltă de mutaţie a *ARN-polimerazei.* Rezultă în mod constant variante antigenice (biochimice) noi ale HA şi într-o măsură limitată, ale NA. Evoluţia pare a fi unidirecţională, deoarece variantele antigenice vechi au o şansă foarte mică să revină în circulaţie.

Noile variante antigenice ale HA şi NA trebuie să-şi păstreze funcţia, adică virionul trebuie să fie infecţios, dar nu este detectat de anticorpii preexistenţi. Fenomenul variaţiei antigenice limitate se numeşte *drift antigenic.*

Shiftul antigenic corespunde unei noi variante genetice a virusului gripal şi este rezultatul unei reasortări a genomului, care are loc cel mai probabil la porc, unde se produce co-infecţia cu un *virus uman* (ce infectează rareori păsările) şi cu o linie de *virus aviar.*

Virusul gripal nu produce o infecţie persistentă în organismul uman, dar apariţia sezonieră a variantelor asigură *persistenţa în populaţia umană.*

Glicoproteinele HIV suferă cea mai amplă variaţie antigenică. În fiecare organism uman infectat, prin fenomene mutaţionale, are loc driftul antigenic şi rezultă noi variante virale (*quasispecii*), care la rândul lor suferă noi mutaţii, rezultatul fiind diversificarea antigenică radiară.

Dacă apariţia mutantelor la ribovirusuri este explicată satisfăcător, constanţa antigenică a altora este surprinzătoare. Poliovirusul, virusul febrei galbene, *Rubivirus*, ca şi unele paramixovirusuri (virusul rujeolei, oreionului), sunt stabile antigenic.

Dezoxiribovirusurile sunt mult mai constante din punct de vedere genetic, deoarece în ciclul multiplicării acumulează mutaţii cu o rată mult mai mică. ADN-polimeraza corectează erorile: sinteza se opreşte până ce baza încorporată greşit este excizată prin activitate 3'exonucleazică. Totuşi, în evoluţie, virusurile ADN au acumulat mutaţii, iar altele au o rată înaltă a recombinării, ceea ce duce la diversitate antigenică: *Papiloma*, parvovirusul canin. Diversitatea antigenică generează tablouri epidemiologice diferite: cele mai multe virusuri există sub forma mai multor serotipuri care se 'rotesc' în populaţia sensibilă şi generează valuri epidemice. Pe măsură ce Ac specifici faţă de un serotip se acumulează în populaţie, un alt serotip, rezistent la acţiunea Ac, produce infecţia.

Interferența cu funcțiile citokinelor. Virusurile întrerup sinteza sau contracarează acțiunea *citokinelor* pe următoarele căi:

- prin sinteza unor proteine *asemănătoare citokinelor* și se leagă de aceiași receptori. VEB codifică o proteină omologă citokinei IL-10, ce inhibă sinteza IL-12 și generarea răspunsului Th1 (represia activității macrofagelor și a IMC);
- prin sinteza unor proteine *asemănătoare receptorilor de citokine* și neutralizează acțiunea citokinelor. Poxvirusurile codifică sinteza unor molecule solubile cu rol de receptori pentru citokine (TNF, IFN γ și IL-1), denumiți *virokine*. Aceste molecule sunt eliberate din celulele infectate și funcționează ca antagoniști competitivi ai citokinelor;
- prin *interferența directă cu sinteza* citokinelor;
- *contracararea efectelor inhibitorii ale IFN* asupra ciclului de multiplicare virală. Virusurile induc sinteza IFN și sunt ținta principală a acțiunii acestuia. Un virus care induce sinteza IFN și este foarte sensibil la acțiunea sa inhibitorie, nu se poate propaga. Evoluția a favorizat virusurile care contracarează efectele IFN. Unele dezoxiribovirusuri codifică proteine ce *inhibă căile majore de transducere* a semnalelor induse de IFN. Astfel, adenovirusurile codifică proteina E_1, care inhibă semnalul indus de IFN α, β sau γ și proteine care antagonizează PKR. Virusurile cu virulență înaltă *inhibă sinteza ARN celular* și a proteinelor (efect de întrerupere), ceea ce interferă cu capacitatea celulei de a produce IFN și de a răspunde la acțiunea lui.

Bibliografie

1. Neurath A. R. 2008. Immune response to Viruses: Antibody mediated Immunity, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, 2008, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.
2. Carmichael A., Patrick Sissons P. J. G. 1998. Viruses, Immunity to, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.
3. Hislop A. D., Taylor G. S., Sauce D., Rickinson A. B. 2007. Cellular Responses to Viral Infection in Humans: Lessons from Epstein-Barr Virus – Annu. Rev. Immunol. 25: 587–617.
4. Seet B. T., Johnston J. B., Brunetti C. R., Barrett J. V., Everett H., Cameron C., Sypul J., Nazarin S. H., Lucas A., McFadden G. 2003. Poxviruses and Immune Evasion. Annu. Rev. Immunol. 21: 377–423.
5. Biron C. A., Nguyen K. B., Pien G. C., Cousens L. P., Salazar-Mather T. P. 1999. Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. Annu. Rev. Immunol. 17: 189–220.
6. Tortorella D., Gewurz B. E ., Furman M. H., Schust D. J., Ploegh H. L. 2000. Viral Subversion of the Immune System – Annu. Rev. Immunol. 18 : 861–926.
7. Kohlmeiere J. E., Woodland D. L. 2009. Immunity to Respiratory Viruses – Annu. Rev. Immunol. 27: 61–82.
8. Sissons J. G. P., Oldstone M.B. 1985. Host Response to Viral Infections, în vol. Virology, ed. by B. N. Fields et al., Raven Press, New York.
9. Whitton J. L., Oldstone M. B. A. 1996. Immune Response to Viruses, în vol. Fields Virology, third Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et. al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
10. Whitton J. L., Oldstone M. B. A. 1990. Virus-Induced Immune Response Interactions. Principles of Immunity and Immunopathology, în vol. Virology, Second Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.
11. Yewdell J. W., Mansour Haeryfar S. M. 2005. Understanding Presentation of Viral Antigens to CD_8^+T Cells in vivo: The Key to Rational Vaccine Design – Annu. Rev. Immunol. 23: 651–682.
12. Guidotti L. G., Chisari F. V. 2001. Noncytolitic Control of Viral Infections by the Innate and Adaptive Immune Response . Annu. Rev. Immunol. 19: 65–91.
13. Welsh M. R., Selin L. K., Szomolanyi-Tsuda E. 2004. Immunological Memory to Viral Infections. Annu. Rev. Immunol. 22: 711–743.
14. Weltzin R., Monath T. P. Intranasal Antibody Prophylaxis for Protection against Viral Disease. Clinical Microbiol. Rev. 12: 383–393.
15. Mogensen S. C. 1979. Role of Macrophages in Natural Resistance to Virus Infections. Micr. Rev. p. 1–26.
16. Mak T. W., Saunders M. E. 2006. Immunity to Pathogens, în vol. The Immune Response. Basic and Clinical Principles, 2006, Elsevier Academic Press.
17. Air G. M., West J. T. 2008. Antigenic Variation, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.
18. Zajac A. J., Harrington L. E. 2008. Immune Response to Viruses: Cell Mediated Immunity, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.
19. Oldstone M. B. A. 2008. Immunopathology, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

23. NOŢIUNI GENERALE DE ONCOGENEZĂ

Orice hipertrofie* localizată a unui ţesut, poartă denumirea de *tumoră***. Ea poate fi determinată de o proliferare celulară sau de inflamaţie. O tumoră determinată de proliferare celulară se numeşte *neoplasm* (creştere nouă). Cancerul este o creştere anormală a celulelor produsă de schimbări multiple în expresia genelor, ce tulbură echilibrul între proliferarea celulară şi moarte, generând o populaţie de celule ce invadează ţesuturile învecinate şi metastazează la distanţă, producând morbiditatea şi moartea gazdei. Neoplaziile s-au descris la toate încrengăturile de organisme (cnidari, echinoderme, cefalopode, amfibieni, păsări), cu excepţia nematodelor şi rotiferilor.

* Schimbările tisulare normale sunt: *hiperplazia* (sunt produse mai multe celule decât cele pierdute: de exemplu, hiperplazia sânului în timpul sarcinii); *metaplazia* (este produs un tip diferit de celule, de exemplu, ţesutul bronşic al fumătorilor, unde se diferenţiază celule squamoase şi nu cele tipice ale epiteliului respirator); *displazia* (celule nediferenţiate sau parţial diferenţiate apar alături de cele diferenţiate).

** Examinarea postmortem a pacienţilor în Grecia antică a relevat că ţesuturile normale sunt invadate de ţesutul tumoral. Creşterea tumorală invadantă se aseamănă cu picioarele unui crab şi de aici a derivat denumirea de cancer (cancer, lb. latină = crab).

Neoplasmele neinvazive rămân localizate la locul formării şi se numesc *benigne*. Celulele benigne se aseamănă cu celulele normale, atât din punct de vedere structural cât şi funcţional. Tumorile benigne sunt înconjurate de o *capsulă fibroasă* şi sunt uşor eliminate prin excizie chirurgicală. In nomenclatura clinică sunt notate cu sufixul *oma*: *lipoma* (ale ţesutului gras), *neuroma* (ale ţesutului nervos), *adenoma* (ale ţesutului glandular), *angioma* (ale celulelor vasculare sanguine şi limfatice), *fibroma* (ale fibroblastelor ţesutului conjunctiv), *condroma* (ale celulelor cartilaginoase). Ele pun viaţa în pericol, numai dacă sunt foarte voluminoase sau dacă secretă în exces substanţe active, ca de exemplu, hormoni.

Tumorile *maligne* sunt letale în mod direct. Masa tumorală este dezorganizată şi rareori delimitată de capsula fibroasă. Tumorile sunt *invazive*, adică invadează şi distrug arhitectura normală a ţesuturilor învecinate. Celule izolate migrează la distanţă de situsul de origine şi iniţiază noi centre de proliferare. Diseminarea celulelor tumorale şi constituirea unor focare de creştere şi multiplicare *secundară* se numeşte *metastazare* (schimbare a localizării).

Gradul de diferenţiere realizează un gradient, de la celulele *stem* (nediferenţiate), până la celule mature (diferenţiate). Tumorile ale căror celule sunt puţin diferenţiate (anaplastice) sunt mai agresive (malignitate de nivel înalt).

Celulele tumorale păstrează o oarecare asemănare cu tipul celular normal de origine şi de aceea este posibilă clasificarea lor după raportul cu ţesutul normal. Tumorile care îşi au originea în *celulele epiteliale ectodermice sau endodermice* sunt incluse în categoria *carcinoamelor* (adenocarcinoma = tumori maligne de origine epitelială glandulară), iar cele originare în *celulele mezenhimale* se numesc *sarcoame* (osteosarcom = tumoră a ţesutului conjunctiv osos (rabdomiosarcom = tumoră malignă a muşchilor scheletici sau tendoanelor).

Denumirea de *blast* se foloseşte pentru tumorile foarte maligne ale vârstei copilăriei. Celulele sunt nediferenţiate şi se aseamănă cu celulele *blastocist* (blastulă). In categoria blastoamelor intră *neuroblastoma (din neuroblaste), retinoblastoma, nefroblastoma* (din celulele embrionare renale).

Leucemiile sunt malignităţi ale leucocitelor (*leukemia* = sânge alb) şi constituie o categorie specială a sarcoamelor.

*Stadializarea** *tumorilor* se face în raport cu următoarele criterii:

* De exemplu $T_2N_1M_0$ semnifică o tumoră primară de dimensiuni medii, diseminată într-un set de ganglioni limfatici, fără metastaze.

- *dimensiunile* tumorii primare (T): de la mici (T_1), până la mari (T_4) ;
- numărul (N) de *ganglioni limfatici* implicați: N_0 (fără implicare ganglionară); N_1 și N_2 (mai mulți ganglioni infiltrați), N_3 (implicare ganglionară extinsă);
- *metastazarea* pe cale sanguină (M): M_0 (fără metastaze); M_1 (tumori secundare la distanță în organe sau în țesuturi).

Pe baza caracterelor TNM, tumorile se clasifică în stadii evolutive:
- stadiul I – tumoră mică, se îndepărtează chirurgical;
- stadiul II – operabil, dar riscul diseminării ulterioare este semnificativ;
- stadiul III – tumora a invadat țesuturile înconjurătoare și nu mai poate fi operată ușor;
- stadiul IV – diseminare metastatică la situri îndepărtate.

Evenimentul primordial al maladiei este procesul biologic al *transformării maligne a celulei.* Cauzele care determină transformarea malignă, sunt multiple și incriminarea uneia sau alteia este însoțită de numeroase incertitudini. Maladia neoplazică nu este unică, ci prin diversitatea substratului celular de origine, a factorilor transformanți, a stadiului fiziologic al celulei în momentul transformării maligne, include *un număr nelimitat* de maladii.

23.1. Agenţii fizici şi chimici ai malignizării

Transformarea malignă este rezultatul acțiunii convergente a numeroși factori de mediu extern și intern, care interacționează și se influențează reciproc:
- *factori umorali* (în special hormoni din sfera genitală);
- *substanțe chimice* de origine industrială (inclusiv numeroase substanțe de uz farmaceutic);
- *substanțe alimentare* modificate chimic prin prelucrare neadecvată;
- *factori fizici* (radiații ultraviolete (UV), radiații ionizante, traumatisme);
- *factori biologici* (virusuri).

Evenimentul declanșator al malignizării celulare este *mutația somatică.* Alterarea mutațională a ADN este cauza fundamentală a malignizării. Celulele somatice sunt cele ce nu sunt destinate să devină celule sexuale. Un argument indirect al rolului mutațiilor este creșterea incidenței tumorilor, odată cu vârsta, fapt explicabil prin necesitatea acumulării mutațiilor somatice, înainte de producerea malignizării.

Factorii interni sau externi care produc mutații și favorizează transformarea malignă a celulelor poartă denumirea de *carcinogeni.*

Dintre factorii fizici, *radiațiile UV* și *ionizante* sunt foarte mutagene. Expunerea tegumentului la lumină UV cauzează producerea neoplaziei tegumentare, iar razele x aplicate la nivelul tiroidei produc cancer tiroidian. Majoritatea celulelor expuse acțiunii agenților mutageni, suferă leziuni incompatibile cu supraviețuirea, dar un număr foarte mic dintre ele se malignizează.

Radiațiile UV pot fi absorbite de bazele ADN și produc modificări chimice. Cea mai comună modificare este formarea *dimerilor* între resturile pirimidinice adiacente pe o catenă sau între resturi situate pe cele două catene opuse. Dimerii interferă cu transcrierea și replicarea. Majoritatea bacteriillor care supraviețuiesc iradierii cu UV nu sunt mutante, ceea ce denotă că efectul mutațional al iradierii este produs în primul rând, în timpul reparării și nu ca o consecință primară a iradierii.

Radiația ionizantă produce ruperi ale catenei de ADN. Capacitatea radiației ionizante de a produce malignități umane, în special leucemii, a fost evidențiată dramatic de creșterea ratei leucemiei la supraviețuitorii exploziei bombelor atomice din cel de al II-lea război mondial.

Ambele tipuri de radiații pot produce neoplazii *in vivo* și transformarea celulelor *in vitro.*

Carcinogeneza chimică. Se disting două categorii mari de carcinogeni: cu acțiune *directă* și *indirectă.*

Carcinogenii cu acțiune *directă* sunt definiți prin proprietatea lor de *reactivitate electrofilă,* adică sunt compuși ce reacționează cu grupările *încărcate negativ* ale altor compuși.

Agenții chimici cu acțiune *indirectă* sunt convertiți la carcinogeni, după dobândirea grupărilor electrofile. Activarea metabolică a carcinogenilor este catalizată de enzimele hepatice, ce detoxifică substanțele toxice ce pătrund în organism: medicamente terapeutice, insecticide, hidrocarburi

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

policiclice şi chiar unele produse naturale liposolubile. Sistemul de detoxifiere produce solubilizarea, adică adaugă *grupe hidrofile* la compuşii insolubili în apă. Procesul de detoxifiere începe cu o serie de reacţii de oxidare, catalizate de enzimele asociate membranelor reticulului endoplasmic. Enzimele pot să oxideze compuşi nereactivi, aşa cum sunt hidrocarburile aromatice policiclice. Prin oxidarea compuşilor aromatici policiclici rezultă un *epoxid*, un *grup electrofil** foarte reactiv. De obicei, epoxizii sunt rapid hidrolizaţi la grupări OH (sub acţiunea enzimei epoxid-hidratază), apoi cuplaţi cu acidul glucuronic sau cu alte grupări, rezultând produşi solubili în apă, ceea ce permite excreţia.

* Epoxidul este un grup funcţional ce constă dintr-un inel cu 3 atomi: 2 atomi de C şi unul de oxigen. Moleculele *electrofile* sunt acelea care conţin *centre pozitive* şi pot reacţiona cu molecule *nucleofile* celulare (molecule care conţin *centre negative*): glutation, proteine, acizi nucleici.

Unii intermediari epoxizi sunt hidrolizaţi mai lent la grupările OH, timp în care cei electrofili şi reactivi acţionează şi îşi manifestă potenţialul carcinogen. Moleculele electrofile pot interacţiona cu grupările încărcate *negativ* ale mai multor tipuri de molecule (proteine, ARN, ADN). Interacţiunea compuşilor electrofili cu ADN este *mutagenă* şi *carcinogenă*.

Mutagenii chimici şi carcinogenii pot produce mutaţii punctiforme, schimbări ale cadrului de citire, ruperi ale catenelor ADN şi aberaţii cromosomale în celulele mamiferelor.

Caracterul mutagen al agenţilor chimici este testat faţă de bacterii. Potenţialul mutagen al unui compus chimic este direct proporţional cu potenţialul carcinogen. De aceea, mutageneza faţă de bacterii a devenit test pentru carcinogeni. Cel mai cunoscut este *testul Ames*. Potenţialul carcinogenic real al unui compus chimic este testat pe animale.

23.2. Etapele procesului de malignizare

Carcinogeneza parcurge câteva stadii: *iniţiere, promoţie, progresie şi conversia malignă.*

În stadiul de *iniţiere*, ADN suferă, cel mai adesea, o alterare nucleotidică. De cele mai multe ori, nucleotidul alterat (adduct) sub acţiunea factorilor mutageni, ori nu produce consecinţe asupra codului genetic al celulei, ori este reparat. Proteinele celulei nu sunt alterate structural sau funcţional. Alteori mutaţia se datorează ruperii unei catene, dar poate fi reparată enzimatic, fără consecinţe negative.

Uneori, alterarea nucleotidică sau ruperea unei catene introduc o modificare ce nu poate fi reparată şi modifică o proteină implicată în reglarea creşterii şi diviziunii celulare. Celula poate dobândi un avantaj al ratei de creştere. O astfel de celulă a parcurs stadiul de *iniţiere* şi devine ţintă a malignizării. Schimbarea genetică în celulă şi iniţierea sunt ireversibile.

Promoţia implică expunerea celulei intacte la un stimul ce favorizează proliferarea selectivă. Rezultă astfel o *clonă de celule preneoplazice*, alterate genetic. Promoţia este reversibilă. Dacă stimulul este îndepărtat, clona celulară suferă procesul de regresie.

Progresia se datorează unui eveniment genetic suplimentar, care apare într-o celulă a clonei preneoplazice şi este consecinţa instabilităţii genetice a unei gene reglatoare. Mutaţiile secundare pot să apară spontan sau sunt produse de factorii de mediu. Clona preneoplazică devine *clonă neoplazică*, cu un avantaj semnificativ al ratei de creştere faţă de celulele normale. Avantajul creşterii poate fi dependent de un hormon sau de un agent patogen infecţios. Dacă factorul stimulator este îndepărtat, tumora regresează.

Conversia malignă este completă dacă una dintre celulele neoplazice dobândeşte o mutaţie suplimentară, inclusiv o mutaţie care face ca ea să devină invazivă şi metastazantă. Sunt selectate cele mai agresive celule, care produc tumora primară. Tumora primară trebuie să inducă *angiogeneza*: celulele sale secretă un factor de creştere a endoteliului vascular (VEGF), cu acţiune mitogenă asupra celulelor endoteliale.

Metastazarea semnifică detaşarea unei celule din masa tumorii primare, deplasarea prin ţesuturi şi supravieţuirea în noul mediu. Celulele metastazante aderă de membrana bazală a ţesutului în care s-a format tumora primară şi invadează matricea extracelulară. Celulele tumorale invadează celulele endoteliale ale unui vas sanguin local. In lumenul vasului, celulele metastazante circulă până aderă la endoteliu, într-o altă parte a organismului. Celulele metastazante parcurg drumul invers, se extravazează din circulaţie şi trec în matricea extracelulară, unde iniţiază creşterea tumorii secundare.

Celula metastazantă are proprietăți alterate de aderență, migrare și supraviețuire. O moleculă importantă pentru metastazare este CD_{44}. CD_{44} este esențială pentru migrarea orientată a celulelor T, dar este exprimată și pe alte celule cu originea în măduva osoasă sau extramedulară. Migrarea celulelor tumorale este preferențială în anumite țesuturi, condiționată de diferite citokine și de receptorii lor.

Unii agenți chimici inductori ai neoplaziei acționează sinergic. In concepția modernă, unii carcinogeni chimici au rolul de *inițiatori* ai malignizării. Inițiatorii sunt carcinogeni care acționează prin efectul lor *mutagen*, dar singuri, de obicei, nu produc malignizarea (deși uneori acționează atât ca inițiatori cât și ca promotori), deoarece mecanismele de reparare a ADN sunt eficiente (acționează rapid și fără erori). Efectul inițiatorilor este desăvârșit de agenți chimici diferiți, denumiți *promotori*. Promotorii nu sunt mutageni, dar mimează efectele factorilor de creștere, deoarece stimulează diviziunea celulară și expresia alterată a genelor. Pentru a fi eficient, promotorul trebuie să fie aplicat după inițiator, în mod repetat, timp de săptămâni sau luni, iar inițiatorul trebuie aplicat o singură dată. Cei mai cunoscuți promotori sunt esterii forbolului. Promotorul nu poate modifica metabolismul celulei, decât consecutiv acțiunii inițiatorului. Rezultatul acțiunii sale poate fi alterarea ADN sau schimbarea stării de diferențiere a celulei. Gudroanele rezultate din arderea țigaretei par a avea acțiune carcinogenă de tipul promotorului.

S-au identificat sute de gene, care, consecutiv unui proces mutagen produc creșterea necontrolată. In ultimii ani, tot mai multe dovezi sugerează că mutațiile genice nu sunt singurele cauze inductoare ale neoplaziei. Adăugarea anumitor grupări chimice la ADN sau la proteinele asociate, poate altera activitatea genică, rezultatul fiind, uneori, malignitatea. S-a raportat că proteina oncogenă mutantă implicată în leucemia acută promielocitară (APL) mobilizează enzime care atașează *grupările metil la ADN* (probabil la secvența genică supresoare a tumorii). Metilarea ADN inhibă activitatea genei și contribuie la transformarea malignă a celulei leucemice. Descoperirea explică *metilarea genelor în celulele maligne*. Genomul celulelor maligne are mai puține grupări metil decât celulele normale, dar genele particulare – inclusiv genele supresoare ale oncogenelor, a căror inactivare induce creșterea celulară excesivă – adeseori sunt mai metilate.

23.3. Caracterele generale ale celulelor normale

Cultivarea celulelor a permis stabilirea unor diferențe, nu totdeauna discriminatorii, între celulele normale și maligne. Se disting 3 tipuri de culturi celulare:

– *culturi primare*, obținute prin dispersia celulelor tisulare cu tripsină (cresc câteva pasaje);

– *linii celulare diploide* denumite și *culturi secundare* se obțin prin pasajul culturii primare. Celulele au suferit o schimbare ce le permite cultivarea limitată (circa 10 pasaje pentru celulele epiteliale și aproximativ 50 de pasaje pentru fibroblaste), dar își păstrează caracterul diploid. După numărul limitat de generații, celulele devin senescente*, mor și cultura se pierde (stadiul 1 de *criză*). Este un raport între durata proliferării *in vitro*, vârsta individului donor și durata de viață a speciei. Liniile celulare de la embrioni și de la organisme tinere trăiesc mai mult decât liniile de la organismele vârstnice, iar cele de la speciile cu viață lungă trăiesc mai mult decât cele de la speciile cu viață scurtă, deși corelațiile nu sunt stricte. Uneori, un număr mic de celule rămân viabile și se multiplică, inițial cu o rată scăzută, dar dacă sunt menținute în cultură chiar pentru mai multe luni, se divid și formează o *linie celulară stabilizată*;

* Senescența este explicată prin scurtarea progresivă a telomerei, pe măsură ce progresează numărul ciclurilor de diviziune, *in vitro* și *in vivo*. Telomerele sunt structurile de la capetele cromosomilor lineari ai eucariotelor și constau din multe copii în tandem ale unei secvențe repetate de nt, de tipul TxGy pe o catenă și CyAx pe catena complementară (x și y variază între 1-4). Telomerele au lungimi variabile, de la câteva zeci de pb, la zeci de mii de pb la mamifere. Secvența TG este mai lungă decât complementul său, cu o regiune de ADN mc de câteva sute de nt la capătul 3'. Scurtarea telomerei are rolul unui ceas molecular ce controlează capacitatea replicativă și intrarea celulelor în senescență. Rolul ei derivă din faptul că ADN-pol nu poate să replice complet capătul 3' al catenei lagging al moleculei lineare. *In vitro*, celulele mamaliene normale proliferează un număr limitat de generații. La limita superioară a numărului de cicluri, una sau mai multe telomere ajunse la dimensiunea critică, declanșează o oprire ireversibilă a creșterii, denumită senescență replicativă sau stadiu 1 de mortalitate (M 1).

Replicarea capetelor cromosomilor (telomere) este catalizată de complexul *telomerazei* și necesită matriță și primer.

Telomeraza este o ribonucleoproteină alcătuită din 2 componente esențiale:

– ARN funcțional, care servește ca matriță pentru sinteza catenei TxGy a ADN telomeric;

– proteină catalitică (hTERT) cu activitate de RT.

Telomeraza este o ADN-pol dependentă de ARN (RT celulară) și oferă situsul activ pentru sinteza secvențelor ADN telomerice dependente de ARN (în direcția 5'–3'), are rolul de a proteja capetele cromosomilor de enzimele degradative și aproape totdeauna constituie baza moleculară pentru potențialul nelimitat de proliferare. Spre deosebire de RT virală,

telomeraza copiază numai o secvență scurtă a ARN pe care o conține. Telomeraza are un rol important în senescența celulară. Activitatea telomerazei lipsește în cele mai multe celule somatice umane, dar este prezentă în peste 90% dintre celulele maligne și în celulele imortalizate *in vitro*.

În timpul fiecărui ciclu de replicare normală, telomerele se scurtează până când nu mai protejează ADN cromosomal și apoi celula moare. Dacă telomeraza este reglată la un nivel înalt, telomerele vor fi menținute deasupra lungimii critice, iar celulele devin nemuritoare. hTERT este, în general, represată în celulele normale și are activitate înaltă în celulele imortalizate. Celulele tumorale au potențial nelimitat de creștere, datorită telomerazei.

Telomeraza cooperează cu oncogenele sau inactivează antioncogenele și induce malignizarea celulelor epiteliale umane și a fibroblastelor.

– *liniile celulare stabilizate* derivă din liniile celulare diploide care scapă senescenței, activează o genă critică pentru ciclul celular (ca de exemplu, p53) și continuă să se dividă. Liniile celulare stabilizate sunt normale, diploide, dar se deosebesc de cultura de origine prin capacitatea de creștere și diviziune pentru perioade lungi de timp, până la o nouă scurtare a telomerei, când ajung la al II-lea blocaj replicativ denumit stadiul 2 de criză sau de mortalitate (M2), caracterizat prin mortalitate masivă, datorat telomerelor scurte și nefuncționale. Puține celule supraviețuiesc crizei din stadiul 2 și sunt capabile să păstreze lungimea telomerei prin activarea telomerazei. Telomeraza condiționează proliferarea celulară nelimitată, adică *imortalizarea*. Liniile imortalizate s-au obținut de la hamsterul sirian, chinezesc, maimuță și rareori de la embrionul uman sau de găină. Imortalizarea poate să fie indusă de iradiere, de oncogenele celulare, de gene virale (E_1 de la adenovirusuri, E_6, E_7 de la papiloma, de EBV);

– *liniile celulare transformate* își au originea în liniile celulare stabilizate sub acțiunea unui eveniment genetic de transformare malignă spontană sau sub acțiunea unui virus oncogen.

Celulele normale au o durată de viață, limitată în timp. Atât *in vivo*, cât și *in vitro*, ele realizează un număr limitat de cicluri de diviziune.

Diviziunea celulelor normale *in vitro* este strict dependentă de următoarele condiții:

– densitatea celulară;

– disponibilitatea factorilor de creștere;

– disponibilitatea unei suprafețe solide la care să adere.

Dependența creșterii de densitatea celulară, se manifestă prin fenomenul *inhibiției de contact*.

Inhibiția de contact sau creșterea dependentă de densitate definește capacitatea celulei normale de a recepționa stimuli din mediul extern și de a înceta diviziunea și mișcările (formarea de pseudopode) în condiții restrictive de spațiu. Consecința creșterii dependente de densitate este că, *in vitro*, celulele normale se divid numai atâta timp cât dispun de spațiul necesar, adică cresc numai până la contactul cu celulele vecine, formând un *monostrat*. Când monostratul este confluent, diviziunea se oprește. *In vitro*, celulele normale realizează o *creștere bidimensională*, iar *in vivo*, consecința creșterii limitate de spațiu este păstrarea riguroasă a arhitecturii țesutului și organului din care fac parte.

Inhibiția de contact este rezultatul unor mecanisme reglatoare complexe. Diviziunea celulelor normale, *in vivo*, este coordonată de semnale multiple din mediul extracelular, recepționate de molecule membranare specializate funcțional, cunoscute sub denumirea generică de *integrine*, adică molecule care integrează activitatea unei celule în contextul ansamblului structural din care face parte.

Denumirea de "integrină" s-a bazat pe concepția că aceste molecule au rolul unor punți de legătură între matricea extracelulară și citoschelet și mediază activitățile de răspuns ale celulei normale, în contextul conviețuirii ei cu celulele vecine.

Integrinele sunt proteine heterodimere transmembranare, cu un plan structural bine conservat. Subunitățile mari (α) conțin 3–4 secvențe repetitive, cu rolul de legare a cationilor și sunt alcătuite din trei domenii: extracelular, transmembranar și citoplasmatic. Subunitatea mică (β) a fiecărei integrine, are numeroase resturi de cisteină și se asociază necovalent cu subunitatea mare.

Celulele normale sintetizează și secretă numeroase componente moleculare, care formează *matricea*. Matricea poate lua forma unei simple *membrane bazale* care constituie suportul unui epiteliu, până la țesuturile conjunctive diversificate (piele, tendoane, ligamente). In structura ei se găsesc fibre (colagen și elastină) și polimeri solubili (proteoglicani*, fibronectină și glicoproteine).

* Proteoglicanii au unul sau mai multe lanțuri de glicozaminoglicani, atașate de o regiune centrală proteică și sunt localizați în celulă, intercalați în membrane și în matrice.

Fibronectina se găseşte atât în matrice cât şi în plasma sanguină. Este alcătuită din două subunităţi neidentice, legate prin punţi disulfurice. Multe tipuri de celule mezenhimale aderă prin fibronectină, iar celulele epiteliale şi endoteliale aderă prin *laminină*. Lamininele se găsesc în toate membranele bazale şi au influenţe majore asupra aderenţei, creşterii, migrării şi diferenţierii celulelor.

Domeniul citoplasmatic al integrinelor se conectează cu *citoscheletul,* acesta la rândul lui fiind mediatorul interacţiunilor celulă-celulă şi celulă-substrat.

Integrinele sunt molecule receptoare pentru un număr mare de molecule matriceale. Prin domeniul lor extern leagă diferite molecule din mediul matriceal şi extracelular şi transmit semnale în interiorul celulei, pe care le preia citoscheletul, cel care condiţionează comportamentul normal ("social") al celulei, care se materializează în fenomenul *inhibiţiei de contact.*

Filamentele de actină ce formează citoscheletul celulei normale au o distribuţie ordonată şi se ancorează pe faţa internă a membranei citoplasmatice. Filamentele citoscheletului preiau semnalele recepţionate de integrinele membranare din mediul extern. In celula normală, filamentele de actină au o orientare bine definită, ceea ce determină o formă constantă şi un anumit grad de rigiditate a acesteia.

Creşterea şi diviziunea celulelor normale *in vitro* este restrictivă în raport cu doi factori: *disponibilitatea factorilor de creştere* şi a *unei suprafeţe solide pentru aderenţă.*

Aportul factorilor de creştere este asigurat de serul* de origine animală, care trebuie adăugat la compoziţia mediului nutritiv. Celulele normale necesită concentraţii mari de factori de creştere deoarece au o capacitate limitată de transport intracelular al moleculelor nutritive şi metabolismul lor este aerob.

* Serul, un produs natural cu compoziţie chimică nedefinită şi calitate variabilă în funcţie de originea sa, oferă celulei factori de creştere, de aderenţă, hormoni, nutrienţi, ioni şi factori inhibitori ai tripsinei; tamponează mediul faţă de variaţiile pH şi are acţiune antitoxică.

Compoziţia serului este complexă. Numeroşi factori de creştere din ser sunt eliberaţi de plachete: PDGF (platelet derived growth factor) şi TGFb (transforming growth factor b) au efecte specifice faţă de anumite tipuri celulare. PDGF este mitogen pentru celulele derivate din mezoderm (fibroblaste) şi pentru astrocite (celule gliale). TGFb este citostatic pentru multe celule epiteliale.

Alţi factori de creştere: EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor), FSH, prolactina, tri-iodotirozina, estradiolul, prostaglandinele.

Serul conţine factori care condiţionează substratul (îi modifică sarcina electrică) şi favorizează aderenţa matricei extracelulare. Fibronectina solubilă din ser pare să aibă rol în aderenţa celulei la substrat.

Serul favorizează creşterea celulelor fibroblastice, mai mult decât a celulelor epiteliale în culturile din ţesuturile normale, ceea ce a stimulat căutarea unor formule de mediu fără ser.

Mediile fără ser conţin insulină, transferină saturată cu Fe, microelemente (Se, Cu, Zn, Mn, Mo, Ni, Va). Alte medii speciale fără ser, utilizate pentru stimularea proliferării celulelor epiteliale, conţin toxină holerică, hidrocortizon sau izoprenalină. Hidrocortizonul acţionează prin creşterea aderenţei pe calea inducerii sintezei proteoglicanilor. Toxina holerică şi izoprenalina cresc concentraţia intracelulară a AMPc, cu efect mitogen pentru unele celule epiteliale.

Precursorii lipidici – colesterolul, acidul linoleic, etanolamina şi fosfoetanolamina, HDL şi preparatele lipidice brute (lipide din soia) sunt adeseori incluse în mediile fără ser, având rol în biosinteza membranelor. Compuşii tiolici – β-mercaptoetanolul – se adaugă ca inhibitori ai stresului oxidativ prin radicalii liberi.

Dependenţa de suportul de *aderenţă* pentru creşterea *in vitro* este o condiţie absolută a celulelor normale (fibroblaste sau de tip epitelial). Dacă sunt menţinute în suspensie (prin agitare), chiar într-un mediu care conţine toţi factorii de creştere, rămân viabile un timp, dar nu cresc şi nu se divid.

Din punct de vedere genetic, celula normală este diploidă.

Particularitatea fundamentală a celulelor normale, este diviziunea cu o rată proprie fiecărui ţesut şi păstrarea arhitecturii normale a acestora.

23.4. Particularităţile funcţionale generale ale celulelor maligne

Transformarea malignă este un proces care se realizează în trepte şi implică cel puţin două clase de funcţii biologice. Prima este cea care determină *imortalizarea*, ceea ce semnifică stabilizarea celulelor *in vitro*, adică dobândirea potenţialului de creştere nelimitată. Imortalizarea nu este un indicator al transformării maligne, pentru că celulele se imortalizează înainte de expunerea la stimuli transformanţi. Stabilizarea unei tulpini celulare se poate face sub acţiunea unor stimuli şi depinde de

predispoziția naturală a celulelor de a dobândi imortalitatea. Celulele sanguine animale sunt imortalizate numai prin transformare, cele aderente umane sunt rareori stabilizate, iar cele de șoarece se stabilizează ușor.

A II-a clasă de funcții este cea care determină *transformarea malignă*, asociată cu modificări fenotipice și fiziologice. Uneori, chiar tumorile benigne progresează spre malignitate și stadiile timpurii ale malignizării sunt greu de identificat.

Distincția dintre celulele normale și cele transformate malign se bazează pe un set de caractere care nu sunt totdeauna evidente și acceptate:

– celulele tumorale pot crește chiar în suspensie;
– necesită o concentrație mai mică de ser sanguin în mediul de creștere;
– au suprafața alterată și membrana lor este mai fluidă;
– numărul de cromosomi este diferit de cel diploid (celulele pot fi triploide, tetraploide sau au extra copii ale unor cromosomi).

Pentru scopuri practice, *o celulă transformată, se definește prin caracterul permanent al creșterii sale, nelimitată în timp și prin capacitatea de a inițiа creșterea tumorii, după transplantare la organismele singenice.*

Celula malignă este mai puțin diferențiată (este dediferențiată), adică a pierdut într-o măsură semnificativă particularitățile structurale și funcționale ale celulei normale de origine. De exemplu, celulele neoplazice hepatice pierd anumite enzime caracteristice celulelor hepatice normale, precum și cele mai multe funcții specifice ficatului.

Celulele maligne se pot distinge de celulele normale prin *analiză microscopică*. Ele posedă caracteristicile celulelor cu *creștere rapidă*, adică au un raport mare N/C, nucleoli proeminenți, mitoze frecvente și o specializare structurală redusă. Prezența celulelor invadante printre celulele normale învecinate este cel mai sigur indiciu al malignității.

Celula malignă este o celulă "anarhică, asocială și antisocială", care nu recunoaște celulele vecine și se divide în ritm propriu. Are aderență scăzută față de vecinele sale și din această cauză, are caracter *invaziv*, adică se desprinde de celulele învecinate, migrează la distanță printre celulele normale și inițiază un nou centru de creștere, la distanță de focarul inițial. Pentru migrare, ele produc atât receptori pentru proteinele membranei bazale, cât și enzime care degradează componentele structurale (colagenul, proteoglicanii, glucozaminoglicanii) ale membranei bazale. Celulele tumorale metastatice pot să adere de celulele endoteliale, ceea ce ușurează migrarea lor, dar în ultimă instanță ele părăsesc patul vascular și încep creșterea într-un mediu străin. Celulele metastatice trebuie să adere de noile tipuri celulare și să se multiplice.

O alterare comună care favorizează metastazarea implică interacțiunea intercelulară a moleculelor de caderină E. Cuplarea intercelulară a moleculelor de caderină E declanșează semnalele ce stopează creșterea, acționând ca supresori ai invaziei și metastazării. La majoritatea carcinoamelor, funcția caderinei E se pierde datorită mutațiilor genice.

Celulele maligne continuă să se dividă în condițiile în care, celulele normale răspund prin încetarea creșterii și diviziunii, atât *in vivo* cât și *in vitro*.

Diferențele dintre celulele transformate malign și cele normale se pot împărți în 4 categorii:

1) modificări ale modului de creștere;
2) modificări ale suprafeței celulare;
3) modificări ale componentelor intracelulare, ce rezultă din prezența genelor transformante;
4) modificări fiziologice;
5) modificări genetice.

l) Modificările *modului de creștere* includ:

a) creșterea la o densitate celulară superioară;
b) necesarul redus de factori de creștere în mediu;
c) diminuarea dependenței de suportul de creștere;
d) formarea tumorilor (tumorigeneza), după injectarea *in vivo*.

Densitatea celulară. Celulele maligne realizează, *in vitro*, densități mari pe unitatea de suprafață, de 5–10 ori mai mari decât celulele normale, deoarece, pierzându-și inhibiția de contact, cresc în straturi suprapuse. Creșterea lor este aglomerată (tridimensională). Pe suportul solid se

formează aglomerări de celule, denumite *microtumori*, iar *in vivo*, pierderea inhibiției de contact se reflectă în caracterul invaziv al creşterii şi în modificarea arhitecturii normale a țesutului.

Scăderea necesarului de factori de creştere. Celulele maligne au necesități scăzute pentru factorii de creştere. Spre deosebire de celula normală, creşterea celulei maligne este relativ independentă de factorii serici stimulatori (hormoni, vitamine, ioni de Ca^{2+}), pentru că produc un spectru de factori autocrini, ceea ce le conferă un grad de autonomie față de ser. Ele pot produce TGFα, cu efect mitogen, care anulează efectul citostatic al TGFb din ser.

Reducerea dependenței de ser este un criteriu pentru identificarea celulelor transformate. În absența serului în mediul de creştere, celulele normale se blochează în faza G_1 şi reiau ciclul după adăugarea serului, dar celulele transformate tind să progreseze în faza S_1, indiferent de concentrația serului.

Celulele tumorale se divid cu o rată foarte înaltă, la concentrații serice foarte puțin favorabile creşterii celulelor normale, deoarece mecanismele de transport membranar a nutrienților (glucoza, aminoacizi etc.) sunt de 5–10 ori mai eficiente, comparativ cu ale celulelor normale, fiind active chiar la concentrații foarte scăzute ale moleculelor nutritive.

Diminuarea dependenței față de suportul de creştere in vitro. Celulele maligne sunt mai puțin dependente de substratul de ancorare. Moleculele membranare de aderență există, dar frecvent prezintă modificări ale domeniului extracelular care modifică interacțiunea lor cu filamentele de actină. În consecință, celulele maligne pierd parțial sau total, dependența de suportul de creştere şi se divid în medii semisolide şi chiar lichide. Pierderea dependenței de ancorare de suport este foarte evidentă, chiar *in vivo*, pentru tumorile lichide (ascite).

Scăderea aderenței față de suport şi față de celulele vecine, creşterea accentuată a mobilității, abolirea capacității de recunoaştere selectivă a semnalelor din mediul extern se explică prin diminuarea cantitativă a integrinelor în membrana celulelor maligne. Datorită scăderii aderenței, celula tumorală se desprinde din angrenajul ei structural şi migrează la distanță, formând *metastaze.*

Acțiunea tumorigenă. Celulele maligne, după injectarea la organisme cu molecule de histocompatibilitate identice se divid şi produc tumori.

Celulele tumorale nu intră în apoptoză. Programul apoptotic este prezent, în formă latentă, în aproape toate celulele organismului. Rezistența la apoptoză este o caracteristică, probabil, a tuturor neoplaziilor. Calea evitării apoptozei este pierderea sau mutația p53, care acționează ca-reglator proapoptotic. Gena p53 are rol de senzor ce recepționează mesajul lezării ADN.

În neoplazie, angiogeneza este un proces esențial pentru creşterea masei tumorale. Tumorile schimbă balanța inductorilor şi inhibitorilor angiogenezei, alterând expresia genică: de exemplu, creşterea expresiei VEGF stimulează angiogeneza.

2) *Modificările suprafeței celulare.* Probabil, cea mai importantă diferență a celulelor maligne, față de celulele normale, constă în *mobilitatea proteinelor* suprafeței celulare. Datorită acestui fapt, anticorpii pot mai uşor să aglutineze o proteină a suprafeței celulelor transformate. Alterarea legăturilor dintre proteinele de suprafață şi elementele citoscheletului, reprezintă baza alterării morfologiei celulelor transformate şi este probabil cauza mobilității proteinelor. Modificările suprafeței se exprimă astfel:

– creşterea gradului de aglutinabilitate cu lectinele din plante;

– modificarea cantitativă a glicoproteinelor şi glicolipidelor;

Lipidele membranare ale celulelor maligne nu au mobilitate superioară.

Celulele transformate malign pierd *fibronectina*, ceea ce explică scăderea aderenței de suport şi creşterea mobilității. Pierderea fibronectinei este consecința ratei scăzute de sinteză, a secreției proteazelor, a turnover-ului ridicat sau a exprimării diminuate a receptorilor de fibronectină pe suprafața celulei. Adăugarea fibronectinei (*in vitro*), derivată din celulele normale, reversează la normalitate morfologia celulelor tumorale.

Pe suprafața celulelor maligne se găseşte o cantitate crescută de *mucopolizaharide*, ce se evidențiază cu colorații speciale.

Celula tumorală conține pe suprafața sa, molecule glicoproteice noi (absente pe suprafața celulei normale), care se comportă ca *antigene*. Sinteza lor este determinată de starea transformată. Antigenele tumorale formează o adevărată rețea moleculară pericelulară.

3) *Schimbările componentelor intracelulare* includ, în primul rând, *modificările citoscheletului.* Independența de creștere față de suportul mecanic se corelează cu modificări ale citoscheletului: pierderea filamentelor de actină sau redistribuirea lor în celulă. În celula normală, filamentele de actină se inseră pe membrana plasmatică, la joncțiunea acesteia cu suportul de creștere. În celula malignă, *filamentele de actină au o distribuție difuză.* Datorită dezorganizării rețelei de actină, celulele maligne sunt mai ușor deformabile. De aceea, la examenul microscopic, morfologia celulelor tumorale este modificată. Pierderea elementelor de citoschelet se asociază cu creșterea mobilității proteinelor suprafeței celulare.

4) *Modificări fiziologice.* In celulele transformate malign, activarea sau supresia unor gene celulare specifice sunt modificări obișnuite, datorate proceselor de *dediferențiere celulară*, ce constau în pierderea într-o măsură mai mare sau mai mică, a funcțiilor specifice celulelor normale de origine.

Celulele maligne sunt *anaplazice,* adică dediferențiate și au caractere structurale și fiziologice apropiate de acelea ale celulei *stem.* Probabil că anaplazia malignă este rezultatul blocării diferențierii celulelor derivate din celulele stem. Celulele tumorilor benigne se aseamănă cu cele normale. În unele cazuri, celulele transformate malign prezintă activități de tipul "uzurpărilor de identitate". De exemplu, tumorile de origine pulmonară produc hormoni hipotalamici (vasopresina) sau hipofizari (hormon corticotrop), fapt explicabil prin derepresia unor gene nefuncționale în celula normală de origine.

Sinteza factorilor de creștere. Factorii de creștere sunt proteine secretate de celulele normale, cu efect stimulator al creșterii celulelor embrionare și diferențiate.

Unele celule transformate produc atât factori de creștere, cât și receptorii corespunzători, ceea ce constituie o modalitate de autostimulare a creșterii, denumită *stimulare autocrină.*

Secreția proteazelor. Celula transformată secretă proteaze, care ușurează procesul de metastazare. Este cunoscută proteaza activatoare a *plasminogenului*, ce clivează o legătură peptidică a plasminogenului seric și-l convertește la *plasmină*, o protează. Secreția unei mici cantități de activator al plasminogenului, determină creșterea concentrației plasminei în plasmă. Celulele normale tratate cu protează, manifestă unele caracteristici ale celulelor transformate (pierderea microfilamentelor de actină, stimularea creșterii), ceea ce sugerează că secreția de activator al plasminogenului favorizează menținerea stării transformate a anumitor linii celulare. *In vivo*, proteaza favorizează metastazarea celulelor maligne prin membrana bazală.

Creșterea ratei sintezei macromoleculelor (ADN, ARN, proteine). În celula malignă, sinteza ADN are loc cu o rată net superioară (de până la 10 ori mai mare), în raport cu celula normală.

Creșterea ratei metabolice. Deoarece mecanismele de transport membranar sunt foarte eficiente, celula tumorală se comportă ca o *capcană de substanțe nutritive.* Transportorul de glucoză are afinitate mult mai mare pentru glucoză, decât cel neuronal sau eritrocitar. Transportul glucozei cu o rată crescută se corelează cu glicoliza înaltă a celulelor maligne.

Celulele tumorale manifestă *efectul Crabtree* – fenomenul de inhibiție a respirației în prezența glucozei. Consecința este că celulele tumorale catabolizează glucoza pe cale predominant *anaerobă* (fermentativă) și produc cantități mari de acid lactic. Catena de respirație celulară, pierde într-o măsură semnificativă, citocromii *a, b* și *c*, prin diminuarea sintezei lor. Astfel, activitatea ciclului Krebs scade până la inhibiția totală.

Rata de creștere și diviziune a celulelor maligne este net superioară față de a celulelor normale de origine, ca o expresie a ratei metabolice foarte înalte.

5) *Modificări genetice.* Informația genetică transformantă (oncogena celulară malignizantă, ADN viral) și produsele de transcriere și traducere (ARNm viral, proteinele virale) sunt prezente constant în celulele transformate de virusuri.

Celulele maligne se caracterizează prin modificări genetice, ce se manifestă printr-o accentuată instabilitate a setului cromosomal. Sunt frecvente modificările numerice ale garniturii cromosomale (aneuploidie). Schimburile intercromosomale de fragmente sunt un marker distinctiv al celulelor maligne. Una dintre modificări este *translocația*, fenomen mutațional prin care un fragment cromosomal de dimensiuni variate este transferat de pe un cromosom, pe altul neomolog. De exemplu, în leucemia mieloidă cronică, un fragment al unui cromosom al perechii 22 este translocat pe un cromosom al perechii 9. Cromosomul mai scurt al perechii 22 se numește *cromosom Philadelphia* și este rezultatul unui proces de translocație nereciprocă. In celulele tumorale au loc, uneori, procese de translocație robertsoniană, prin care cei doi cromosomi telocentrici, fuzionează prin centromerii lor, rezultând un cromosom metacentric sau submetacentric.

23.5. Oncogenele celulare

Denumirea de "oncogene" semnifică faptul că sunt gene care au potențialul de a determina transformarea malignă a celulei, sub acțiunea inductoare a unor factori de mediu, fiind astfel implicate în dezvoltarea neoplaziilor. Transformarea malignă indusă de virusurile oncogene ARN și ADN presupune interacțiunea genomului viral cu oncogenele.

Oncogenele* sunt componente ale *setului normal* de gene celulare și se numesc *oncogene celulare (c-onc)* sau *protooncogene*. Disfuncția lor produce transformarea malignă. Unele (ras, jun) au o constanță evolutivă remarcabilă, fiind prezente de la levuri până la om.

* Oncogenele celulare s-au descoperit în studiile cu retravirusurile care determină transformarea rapidă a celulelor *in vitro*. Celulele normale conțin copii foarte înrudite cu gene transformante retravirale. Secvențele celulare s-au izolat și s-au încorporat în genomul retraviral. Alte oncogene celulare au fost detectate cu metode moleculare.

Oncogenele celulare codifică sinteza *oncoproteinelor*, localizate în toate compartimentele celulei: membrană, citoplasmă și nucleu. In condiții normale, oncogenele și oncoproteinele îndeplinesc funcții esențiale pentru controlul *creșterii, diviziunii* și *diferențierii celulelor* în *cursul dezvoltării embrionare*. Protooncogenele sunt foarte bine conservate în evoluție și expresia lor este controlată prin mecanisme multiple. Oncoproteinele controlează proliferarea normală, diferențierea și apoptoza. În condiții de dezechilibru funcțional (mutație, translocație cromosomală, amplificare genică sau inserția unui promotor), oncogenele și oncoproteinele sunt efectorii transformării maligne.

Creșterea normală și malignitatea sunt cele două variante funcționale ale celulelor.

Creșterea celulară normală este controlată de 5 tipuri de proteine, codificate de oncogene:

- factori de creștere (de exemplu, gena *sis* codifică lanțul β al PDGF);
- receptori de factori de creștere cu acțiune tirozin-kinazică: erbB (codifică EGFR), fms (codifică CSF-1 R). Pentru unele proteine membranare cu rol de receptor, ligandul nu este cunoscut;
- transductori intracelulari ai semnalului: acestea sunt poteine membranare din familia Ras care leagă guanina, au activitate GTP-azică și au rol de transductori ai semnalelor eliberate de receptorii factorilor de creștere (tirozin-kinaze, de exemplu, *src*);
- factori nucleari ai reglării transcrierii (de exemplu, *myc, myb, fos, jun, erbA* și *rel*);
- proteine care controlează ciclul celular (cicline).

Factorii de creștere, ca și hormonii, nu au efecte metabolice, dar au rolul de semnale, fiind liganzi pentru receptorii specifici și induc răspunsuri multiple (diferențierea, intrarea în ciclul mitotic). Evenimentele celulare încep cu interacțiunea ligand-receptor, fie la suprafața celulei, fie în interiorul ei.

Oncoproteinele din membrană citoplasmatică sunt *integrine*, adică molecule care mediază integrarea celulei în ansamblul tisular și au rol de *receptori* ai semnalelor din mediu (fig. 444). Cei mai cunoscuți receptori intra-celulari sunt cei pentru *steroizi*.

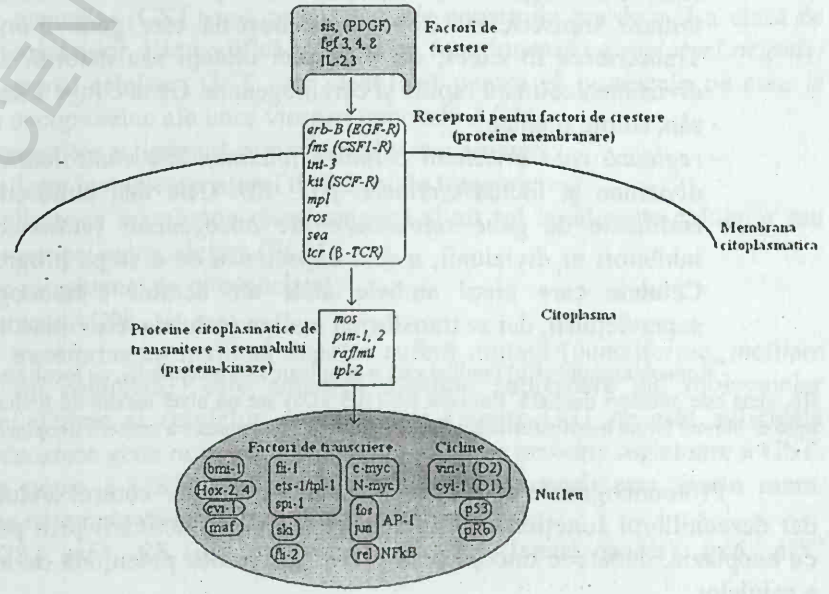


Fig. 444. Oncoproteinele sunt localizate în toate compartimentele celulei, fiind componente ale catenelor care controlează creșterea și diviziunea.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Celula normală se caracterizează prin capacitatea de a recepționa și de a răspunde adecvat semnalelor pe care le primește din mediul extracelular. *Semnalul* stimulator al creșterii ajunge la suprafața celulei sub forma unui *factor polipeptidic*, care se leagă cu *receptorul* membranar. Adeseori, receptorul celular este o proteină membranară integrată, cu activitate specfică, tirozin-kinazică.

Mecanismul general de acțiune a oncoproteinelor membranare este următorul: după ce au legat o moleculă semnal din exterior, oncoproteinele dobândesc proprietăți *fosfokinazice*. Molecula receptor se dimerizează, activitatea ei kinazică crește și resturile de *tirozină* din secvența citoplasmatică se *autofosforilează*. Semnalul recepționat este transmis prin fosforilarea unei catene de proteine citoplasmatice, până în nucleu. Receptorul final al semnalului este un factor activator al transcrierii, ce controlează un set de gene.

* Celulele își reglează activitatea prin fosforilarea enzimelor și a altor enzime. Fosforilarea are avantajul că este rapidă, nu necesită sinteză sau degradare proteică pentru a schimba activitatea metabolică a celulei. Efectul este reversat sub acțiunea protein-fosfatazelor, care scot grupul fosfat. Multe enzime se activează prin fosforilare și se inactivează prin defosforilare. Proteinele pot fi fosforilate la tirozină, serină sau treonină sau la histidină. Fiecare dintre acestea necesită o clasă de kinaze.

Oncoproteinele citoplasmatice sunt componente ale *catenei de propagare* a semnalului recepționat la suprafața celulei și constituie cel mai numeros grup. Cei mai cunoscuți transductori sunt *proteinele G**, iar una dintre ele (G_S), activată de un receptor de suprafață, leagă GTP și activează adenil-ciclaza, ce sintetizează AMPc.

* Proteinele G se numesc astfel deoarece leagă GTP. Un grup de gene implicate în transducerea semnalului intracelular aparțin familiei *Ras*. Gena *Ras* (rat sarcoma) suferă frecvent mutații în tumorile induse chimic la animale și au cea mai înaltă rată a mutației (20-30%), în tumorile umane colorectale, pancreatice sau tegumentare. Familia *Ras* cuprinde variantele H-ras (*H*arvey), K-ras (*K*irsten) și N-ras (*N*euronală), toate fiind activate mutațional în numeroase tipuri de tumori induse de factori fizici și chimici. Fiecare genă Ras codifică o proteină de 21 kDa, cu rol în transducerea semnalului celular.

Alte proteine din aceiași clasă (*Src, Abl*) sunt *protein- tirozin-kinazice* (PTK).

Oncoproteinele nucleare sunt componentele terminale ale catenei proteice și îndeplinesc următoarele funcții:

- *reglează sinteza ADN;*
- *reglează proporția transcrierii diferitelor molecule de ARNm*, pentru că celulele care cresc sintetizează proteine cu rate mai mari față de celulele în repaus. Transcrierea este controlată prin două tipuri de secvențe de ADN: *promotori* (localizați la punctul de start al transcrierii) și *secvențe stimulatoare* (enhancer), situate mai departe de situsul de start. Controlul transcrierii este exercitat de proteine specifice, denumite *factori nucleari de transcriere.* Aceștia se leagă de secvențele specifice și accelerează sau întârzie rata cu care ARN-pol II inițiază transcrierea. Cea mai cunoscută este gena *c-myc*, stimulatoare a proliferării. Transcrierea în exces, datorită unei mutații sau datorită amplificării genice, favorizează diviziunea celulară rapidă și carcinogeneza. Gena c myc este amplificată în carcinoamele de sân, colon, plămân;
- *reglează rata diviziunii celulare (cicline).* Ele controlează intrarea celulelor în ciclul de diviziune și includ *ciclinele, p53, RB.* Cele mai cunoscute sunt proteinele RB și p53, codificate de *gene supresoare ale oncogenelor* (antioncogene). Ambele acționează ca inhibitori ai diviziunii, având capacitatea de a stopa progresia celulelor spre malignizare. Celulele care pierd ambele alele ale acestor antioncogene au avantajul selectiv al supraviețuirii, dar se transformă malign (celulele retinoblastomului*).

* Retinoblastomul (Rb) familial este o neoplazie rară a copilăriei, cu localizare într-un ochi sau în ambii. In tumorile Rb, gena este adeseori deletată. Proteina Rb (105 kDa) are un nivel maxim de fosforilare în timpul fazei S și minim după mitoză. Numai forma hipofosforilată a RB are activitate de supresie a creșterii neoplazice.

Protooncogenele exprimate în condițiile unui control celular normal nu sunt oncogene, dar dezechilibrul funcțional al acestor gene datorat activării prin procese mutaționale este asociat cu neoplazia, deoarece oncoproteinele au capacitatea potențială de a induce transformarea malignă a celulelor.

S-au identificat peste 100 de oncogene, dintre care circa 30 au rol major în neoplaziile umane.

Genele *c-onc*, foarte active în timpul dezvoltării embrionare, esențiale pentru diferențierea celulară, ulterior se *represează*, unele complet, iar altele sunt transcrise cu o rată foarte scăzută. Toate oncogenele își păstrează capacitatea de a-și *relua activitatea* și respectiv, de a și-o intensifica în diferite condiții:

– după infecția cu un virus oncogen;
– sub acțiunea unor factori de mediu (substanțe cancerigene, radiații UV sau ionizante);
– după mutații punctiforme care determină creșterea ratei de transcriere.

Toți acești factori activează potențialul transformant al oncogenelor.

Oncogenele celulare (protooncogene) s-au izolat din țesuturile normale, iar corespondentele lor malignizante, s-au izolat de la retravirusuri și din țesuturi maligne umane.

Cea mai cunoscută *oncogenă celulară* (protooncogenă) este *c-src*, omologă cu gena *v-src* a virusului sarcomului Rous. Gena *c-src* se găsește la păsări, pești, mamifere, om și este esențială pentru celulă. Ea codifică sinteza unei tirozin-kinaze (enzima care fosforilează proteinele la nivelul resturilor de tirozină).

Oncogenele din celulele normale au corespondent în celulele maligne. Uneori, cele două gene sunt identice, iar alteori se deosebesc printr-o singură pereche de baze, oncogena malignizantă fiind o *mutantă punctiformă* a genei normale. Substituția unui singur aminoacid în proteina codificată, poate converti o protooncogenă într-o oncogenă.

Conversia unei protooncogene în oncogenă se face prin mecanisme multiple, dar toate implică modificări genetice:

– schimbarea unei singure baze prin *mutație punctiformă*, determină apariția unei variante genice noi. Gena poate fi supraexprimată și proteina codificată se sintetizează în *exces*, modificând rata creșterii celulare;
– oncoproteina codificată de *gena mutantă*, poate fi o moleculă mai stabilă și astfel activitatea ei biologică va crește;
– *translocația* într-o nouă localizare și trecerea unei gene sub controlul unui alt promotor, sau separarea de un element reglator adiacent, poate altera expresia protooncogenelor. O protooncogenă poate să devină oncogenă, când intră sub acțiunea reglatoare a *promotorului viral*, care poate avea o activitate semnificativ superioară promotorului normal. După inserția ADN viral într-un cromosom al celulei, oncogena poate fi exprimată la o rată mai înaltă decât protooncogena;
– gena este exprimată într-un moment nepotrivit al ciclului celular sau într-un țesut neadecvat.

Activarea oncogenelor sau inactivarea antioncogenelor este numitorul comun al tuturor tipurilor de neoplazii.

Genele supresoare ale tumorilor (GST) sau *antioncogenele* constituie cea de a II-a clasă de gene implicate în dezvoltarea neoplaziilor. Ele codifică proteine ce funcționează ca *reglatori negativi* ai creșterii sau ca reglatori ai morții celulare. GST s-au identificat pentru că proteinele pe care le codifică formează complexe cu oncoproteine ale unor virusuri tumorale ADN.

Genele supresoare ale tumorilor acționează prin mai multe mecanisme:

– codifică proteine localizate în nucleu și au rol de factori de transcriere;
– codifică proteine localizate în membrana citoplasmatică și au rol în aderența celulelor sau sunt componente ale matricei extracelulare (ECM);
– mediază interacțiunile membranei cu citoscheletul;
– sunt implicate în repararea ADN.

GST sunt implicate în transformarea malignă după ce suferă mutații (punctiforme, metilare punctiformă, deleție parțială sau completă), care anulează efectele supresoare ale moleculelor codificate. Datorită caracterului diploid al celulelor, mutația unei singure GST nu este suficientă pentru transformarea malignă, deoarece gena normală continuă să codifice proteina reglatoare a GST. Dacă este inactivată și a II-a copie a GST, predispoziția la apariția tumorii este foarte mare. Fenomenul se numește pierderea *heterozigoției* (LOH = *L*ost *o*f *h*eterozygosity).

Se cunosc circa 18 GST: *p53, Rb* (retinoblastoma), *BRCA1* (breast cancer), *p16, APC* (adenomatous polyposis coli).

Prototipul GST este *rb*. Proteina *Rb* (105-110 kDa) este localizată în nucleu şi reglează ciclul celular: formează complexe cu factorii reglatori ai transcrierii din familia E_2F şi inhibă intrarea celulei în faza S. Funcţia proteinei normale Rb este reglată prin fosforilare. Pierderea funcţiei ambelor gene Rb predispune la apariţia retinoblastomului, o tumoră retiniană rară la copiii foarte mici (40% sunt cazuri familiale, 60% sunt cazuri sporadice).

p53 s-a descoperit sub forma unui complex cu antigenul T de SV_{40}. p53 are localizare nucleară şi controlează proliferarea celulelor şi supresează tumorigeneza. Este un factor de transcriere cu rol reglator al progresiei ciclului celular şi al morţii celulare şi este considerată un 'paznic al genomului'.

După lezarea ADN, p53 este activată prin fosforilare, de acţiunea enzimelor de reparare a ADN. Rolul ei este de a stopa desfăşurarea ciclului în celulele al căror ADN este lezat, astfel încât enzimele de reparare au şansa să repare eroarea sau, dacă eroarea nu poate fi reparată, p53 determină *intrarea celulei în apoptoză*. In absenţa p53, celulele care au suferit mutaţii, pot supravieţui şi creşterea lor favorizează acumularea altor mutaţii ce nu pot fi reparate. Astfel creşte riscul formării tumorii.

p53 este mutantă în peste 50% dintre neoplaziile umane. În unele celule tumorale, mutaţia se detectează într-o singură alelă a p53. Heterozigoţia genei p53 predispune la neoplazie, datorită structurii homotetramere a proteinei p53. Intr-o celulă în care o genă este normală şi cealaltă este mutantă, se poate forma un homotetramer în care 3 catene sunt normale, iar cea de a IV are conformaţie alterată şi tetramerul este nefuncţional. Mai mult, tetramerul proteinelor mutante sechestrează catenele normale şi şansa formării proteinei funcţionale scade.

În evoluţie, oncogenele nu s-au diversificat pentru a produce neoplazii, şi nici TSG pentru a represa neoplaziile: oncogenele sunt funcţionale în timpul proliferării rapide, când ţesuturile embrionare cresc rapid şi se diferenţiază, iar TSG sunt gene care stopează diviziunea celulară şi permit diferenţierea. Din acest punct de vedere, transformarea malignă este consecinţa unei diferenţieri incomplete sau eronate, ulterior asociată cu proliferarea necontrolată.

Bibliografie

Razin A., Cedar H. 1991. DNA methylation and gene expression. Microbiol. Rev. 55 (3): 451–458.
Freifelder D. 1987. Tumor Viruses and Oncogenes în vol. Molecular Biology, Sec. Edition.
McLeod G. R. 1993. Ultraviolet Light and Skin Cancer. Karger Gazette, no. 56.
Mişcalencu D. 2002. Cancerizarea chimică, Ed. Universităţii Bucureşti.

23.6. Oncogeneza virală

Convenţional, *virusurile oncogene* (tumorigene) sunt acelea care produc neoplazii prin conversia malignă a celulelor infectate. Pentru unele virusuri, potenţialul transformant a fost demonstrat numai pentru celulele *in vitro*.

Ipoteza originii virale (infecţioase) a neoplaziilor este veche. În 1903, Metchnikoff şi Borell au presupus ca tumorile maligne s-ar putea datora infecţiei cu agenţi patogeni. În 1908, Ellerman şi Bang au arătat că leucoza găinilor poate fi transmisă de la organismele bolnave, la cele sănătoase, prin filtratul acelular al sângelui. În 1911, P. Rous a izolat virusul dintr-un sarcom pectoral spontan al puilor de găină şi a adus dovada experimentală, că sarcomul (o tumoră solidă) este produs de un agent filtrant. Descoperirea sa a fost prea timpurie faţă de nivelul general al cunoaşterii şi nu s-a impus atenţiei. Cercetările au fost abandonate, dar pentru valoarea deosebită a rezultatelor investigaţiilor, lui P. Rous i s-a decernat, postmortem, premiul Nobel (1966).

Unul dintre factorii majori ai neîncrederii în originea posibil infecţioasă a neoplaziei provenea din faptul că tumorile nu se transmit de la organismul bolnav la cel sănătos. Tumorile organismelor animale şi umane nu sunt infecţioase în crescătorii sau în spitale. Observaţiile clinice sugerau că tumorile apar din alte cauze decât cele infecţioase, rolul factorilor chimici fiind preponderent:

– la şoarece, badijonarea regională a tegumentului cu gudroane, provoacă o iritare cronică şi apariţia, în timp, a tumorilor maligne;

– existenţa neoplaziilor profesionale: tumori tegumentare la personalul unităţilor radioactive, expus iradierilor accidentale, neoplazia scrotală la coşari;

– cancerul pulmonar la fumători (componetele cancerigene sunt gudroanele rezultate din arderea tutunului şi a foiţei). În zonele geografice unde tutunul se mestecă, tumorile sunt localizate pe limbă sau pe mucoasa bucală.

Problema originii infecţioase a unor tumori a fost reluată de către L. Gross (1952), care a descoperit virusul leucemiei şoarecelui. S-a considerat că şoarecele este un organism oarecum "artificial", datorită gradului înalt de consanguinizare. În 1964 s-a evidenţiat cu certitudine, natura virală a unei tumori umane: virusul Epstein-Barr este agentul declanşator al proliferării celulare ce produce *limfomul Burkitt* (o tumoră a regiunii maxilare, la copiii între 4 şi 15 ani), cu originea în limfocitele B.

Cercetările ulterioare, pe sisteme celulare *in vitro,* au scos în evidenţă că un număr mare de virusuri, în special cu genom ADN au capacitatea de a induce transformarea malignă a celulelor.

În regnul vegetal există o dovadă certă a originii infecţioase a proliferării celulare necontrolate: tumorile de colet (crown gall) sunt produse de *Agrobacterium tumefaciens*, o bacterie heterotrofă din sol. Proliferarea celulară necontrolată este rezultatul transferului plasmidei *Ti* (*T*umor *i*nducing), în celulele plantei.

Virusurile produc 15–20% din totalul neoplaziilor umane. Din cele peste 600 de virusuri, infecţioase pentru om şi animale, circa 150 sunt considerate *potenţial oncogene* şi sunt distribuite în următoarele grupe:

– *Oncornavirusuri*, virusuri oncogene cu genom ARN din familia *Retraviridae*;

– *Oncodnavirusuri*, virusuri oncogene cu genom ADN, care aparţin câtorva familii.

Familia *Papovaviridae*, cu subfamiliile *Papillomavirinae* (g. *Papillomavirus*) şi *Polyomavirinae* (g. *Polyomavirus),* virusurile vacuolante *(SV_{40})*. Papilomavirusurile determină apariţia papiloamelor la numeroase specii: om, feline, bovine, iepure. Papiloamele au o evoluţie benignă, dar uneori pot progresa la un carcinom metastazant. Virusul polioma induce tumori la şoarece. SV_{40}, în condiţii naturale, infectează maimuţele (*M. rhesus, Cercopithecus, Cynomolgus*). Tumorile produse de *Polyoma* şi de virusurile vacuolante la puii de rozătoare sunt delimitate de o capsulă bine diferenţiată, necrozează extensiv în zona centrală şi nu metastazează.

Familia *Adenoviridae*. Opt din cele aproape 50 de serotipuri care infectează omul, produc sarcoame la hamsterul nou născut. Cele mai oncogene sunt serotipurile 12, 18 şi 31, iar serotipurile 3, 7, 14, 16 şi 21 au activitate oncogenă slabă. Potenţialul oncogen s-a evidenţiat la 6 serotipuri infecţioase pentru maimuţă, precum şi la altele izolate de la bovine şi câine.

Familia *Herpesviridae*. La om *virusul Epstein-Barr* este agentul inductor al limfomului Burkitt. *Virusul Lucke* produce adenoame şi adenocarcinoame ale rinichiului broaştei leopard. La păsări, *virusul Marek* produce o neurofibromatoză, caracterizată prin proliferarea invazivă a limfocitelor T.

Familia *Hepadnaviridae. Hepadnavirus* (virusul hepatitei B) produce carcinomul hepatocelular.

Familia *Poxviridae.* Unele poxvirusuri induc răspunsuri hiperplazice şi chiar tumori în tegumentul animalelor infectate: *virusului fibromului Shope, Yaba virus, Moluscipoxvirus*. În unele cazuri s-a observat stimularea replicării ADN şi pierderea inhibiţiei de contact. ADN viral nu se integrează în genomul celular.

Virusurile oncogene sunt potenţial transformante *in vivo*, dar unele transformă numai celulele *in vitro*.

Alte virusuri, (HIV) favorizează indirect dezvoltarea şi creşterea tumorilor, de exemplu, prin blocarea răspunsului imun antitumoral.

Modificările de natură malignă a celulelor, *in vitro,* apar la 12–48 de ore după infecţie.

Pentru ca un virus sa fie oncogen trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

– informaţia genetică virală *să se replice în nucleul celulei* şi să aibă capacitatea de a se integra în ADN celular, ceea ce permite genomului viral să persiste în genomul celulei şi să se transmită generaţiilor succesive de celule;

– să conţină *informaţie genetică transformantă*, care să inducă trecerea celulei de la starea normală la cea malignă, sau dacă nu conţine gene transformante, *să interfere* cu activitatea *oncogenelor celulare*.

Transformarea malignă este rezultatul acțiunii genelor *oncogene ale virusurilor cu genom ADN*, a *oncogenelor virusurilor cu genom ARN*, a *oncogenelor celulare* (protooncogene) și a *genelor supresoare* ale oncogenelor celulare denumite *antioncogene*. Antioncogenele codifică proteine care inhibă creșterea și multiplicarea celulară.

Pentru a-și exercita efectul transformant, virusurile oncogene acționează sinergic cu alți factori de mediu sau genetici, denumiți factori *co-carcinogeni*.

Trăsăturile generale ale transformării maligne sub acțiunea virusurilor oncogene sunt următoarele:

a) Teoretic, transformarea este rezultatul infecției celulei cu o singură particulă virală;

b) Transformarea este însoțită de persistența întregului genom viral sau numai a unei părți a acestuia, integrate în ADN celular. Fenotipul celulei transformate poate fi reversat la cel normal, prin interferența specifică cu funcțiile moleculelor virale efectoare.

c) Transformarea este însoțită de exprimarea continuă a unui număr limitat de gene virale. Uneori, o singură genă virală este suficientă pentru a menține starea transformată.

d) Tumorile induse de virusuri conțin copii ale genomului viral sau o parte a genomului, de cele mai multe ori integrat în genomul celulei.

Studiul transformării maligne sub acțiunea virusurilor este important pentru descoperirea etiologiei virale a unor neoplazii, precum și pentru evidențierea protooncogenelor activate în neoplazii de etiologie nevirală.

23.6. Retravirusuri oncogene transductoare și netransductoare

Retravirusurile oncogene sunt grupate în subfamilia *Oncovirinae*. Interacțiunea lor cu *oncogenele celulare* a furnizat singura cale de acces pentru studiul acestor gene.

În raport cu capacitatea lor de a încorpora oncogene celulare în genom, retravirusurile oncogene aparțin următoarelor două grupe:

– *transductoare*, sunt acelea care poartă oncogene celulare în genomul lor;

– *netransductoare*, caracterizate prin absența oncogenelor celulare în structura lor genomică.

23.6.1. Oncogenele virusurilor transductoare

Retravirusurile sunt singurele printre virusurile infecțioase pentru animale, care au capacitatea de a încorpora fragmente ale unor gene celulare (c-onc = protooncogene) în genomul lor și de a altera structura și expresia lor fenotipică, astfel încât ele transformă celula normală în una malignă.

Retravirusurile transductoare poartă în genomul lor gene oncogene (*v-onc*), foarte asemănătoare, până la identitate, cu genele *c-onc* (tabelul 69). Asemănarea celor două categorii de gene a fost evidențiată prin analiza *secvenței de baze* și prin tehnicile de *hibridare moleculară in situ*.

Toate oncogenele retravirale sunt derivate din genomul gazdei și reprezintă o achiziție recentă.

Cele mai productive surse de oncogene virale au fost animalele, la care infecția cu virusurile leucemice este comună: puiul de găină, pisicile de casă care fac frecvent tumori.

Denumirile protooncogenelor sunt prescurtări sau acronime pentru virusurile sau țesuturile de origine. Aceste gene codifică sinteza unor *tirozin-kinaze* (src), *treonin-kinaze*, a unor proteine care se asociază cu ADN și au rol în reglarea replicării sau a unor proteine reglatoare ale creșterii și diviziunii celulare, asemănătoare ca acțiune, factorilor de creștere.

Genele v-src și c-src au fost primele, oncogenă, respectiv protooncogenă, identificate. Gena v-src este gena transformantă a VSR ce produce transformarea neoplazică a mușchiului pectoral al puiului de găină. V-src codifică o fosfoproteină ($p60^{v\text{-}src}$), o tirozin-kinază. C-src este omologul celular al v-src în celulele normale de pui de găină. Studiile de hibridare moleculară *in situ* au argumentat că gena *v-src* a virusului sarcomului Rous (VSR) este de origine celulară.

Concluzia este că v-src a derivat din ARNm înnădit al genei c-src: gena *v-src* a fost încorporată de virus sub forma ARN din celula gazdă și astfel virusul a dobândit proprietăți oncogene.

Tabelul 69.

Sursa şi denumirile celor mai reprezentative *oncogene retravirale.*

Oncogena celulară	*Virusul transductor*	*Sursa de celule maligne*
Abl	Virusul leucemiei murine Abelson (MuLV)	Limfomul celulelor B de şoarece şi om
Erb A, erb B – tirozin- kinază cu rol de receptor pentru EGF.	Virusul eritroblastozei aviare (VEA).	Fibrosarcom şi leucemie de pui de găină.
Fes, fgr, fms	Virusul sarcomului felin	Fibrosarcom felin
Fos	Virusul osteosarcomului murin (FBJ MuSV)	Condrosarcomul de şoarece
Fps	Virusul sarcomului Fujinami (FuSV)	Sarcom de pui de găină
H-ras, N-Ras, K-Ras codifică proteine din familia G (cele care leagă GTP şi îl hidrolizează la GDP). Au rol în transducerea semnalului factorilor de creştere.	Virusul sarcomului murin Harvey, respectiv virusul sarcomului Kirsten.	Sarcom de şobolan, carcinom uman şi de şobolan.
Hst, Int -2 - factori de creştere ai fibroblastelor	–	Carcinom gastric, respectiv de sân
Myb, myc – factori de transcriere ce conţin un domeniu N-terminal de legare la ADN. Proteinele c-Myb şi v-Myb se leagă la ADN şi transactivează genele ce leagă Myb la promotorul lor. Expresia *c-myc* este esenţială pentru progresia ciclului celular şi pentru diferenţiere. Scăderea expresiei c-myc în celulele hematopoetice se corelează cu diferenţierea terminală, iar expresia constitutivă duce la blocarea procesului de diferenţiere.	Virusul mieloblastozei aviare (AEV)	Celule leucemice de pui de găină şi celule leucemice umane
Rel	Virusul reticuloendoteliozei	Leucemie limfoidă de curcan
Sis – factor de creştere derivat din plachete.	Virusul sarcomului simian (VSS)	Sarcom de maimuţă
Src – o tirozin kinază non – receptor.	Virusul sarcomului Rous	Sarcom de pui de găină
Jun – factor de transcriere		Osteosarcom, carcinom tegumentar
PKC – serin-treonin kinază		Carcinom tegumentar
Raf – serin- treonin kinază		Carcinom hepatic, pulmonar
Bcl-2 – factor antiapoptotic		Limfoame.

Ipoteza originii celulare a *v-src* este sprijinită de faptul că mutantele virale rezultate prin deleţia genei *src*, se multiplică normal. Rezultatele se pot extrapola pentru toate oncogenele *transduse* de retravirusuri.

Comparaţia v-ras şi c-ras relevă că oncogenele virale conţin două mutaţii punctiforme care îi modifică activitatea GTP-azică şi o fac insensibilă la reglarea negativă.

Genele retravirale oncogene *nu conţin introni*, în timp ce oncogenele celulare sunt totdeauna discontinui. Există şi alte gene care şi-au pierdut intronii, dar nu se cunoaşte nici una care să-i fi dobândit.

Virusurile transductoare au o eficienţă foarte mare de transformare a celulelor *in vitro* (24–48 de ore) iar *in vivo* produc tumori la *câteva zile* după inoculare. Este o *transformare acută*, iar tumorile sunt *policlonale* (de exemplu, mielo-monocitoza indusă la pui de virusul leucemiei aviare, MC29).

Virionul are rolul unui *vehicul transductor* pentru oncogenele de origine celulară. După ce au fost transduse într-o nouă celulă, transcrierea lor este controlată de genomul viral.

Mecanismul transducţiei oncogenelor celulare este ipotetic. Se admite că integrarea genomului viral ca provirus are loc în proximitatea unei *oncogene celulare*, în amonte, în raport cu promotorul ei, în aceiaşi orientare de transcriere. Transcrierea genomului viral, catalizată de aparatul enzimatic al celulei, se extinde asupra oncogenei celulare, deoarece gena *c-onc* trece sub controlul promotorului viral. Astfel, este transcrisă o moleculă *himeră* de *ARN, care conţine atât copia provirusului cât şi a oncogenei celulare*. Copia de ARN este prelucrată prin mecanismul clivării şi înnădirii (intronii sunt excizaţi) şi *ARN himeric* va forma genomul virionilor progeni.

O altă ipoteză presupune că încorporarea genei *c-onc* este rezultatul unui eveniment *postînnădire* al copiei de ARN celular, în etapa transcrierii inverse printr-un mecanism de alegerea matriţei.

Informaţia *onc* transdusă înlocuieşte o parte a informaţiei genetice virale. Ca urmare, virusurile transductoare sunt *defective ale ciclului de multiplicare*, deoarece în capsidă poate fi împachetată o cantitate limitată de ARN genomic, iar oncogena celulară a înlocuit total sau parţial o secvenţă esenţială pentru multiplicare.

Retravirusurile defective codifică majoritatea etapelor ciclului de multiplicare: revers-transcrierea, integrarea, sinteza ARN şi traducerea. Ele produc transformarea malignă a celulelor pe care le infectează, dar nu se asamblează virus progen, deoarece nu se sintetizează proteine structurale. Virionii progeni se asamblează numai dacă aceiaşi celulă este infectată de un retravirus cu ciclu complet de multiplicare, care suplineşte deficienţele virusului defectiv.

VSR, transductor al genei *v-src*, este o excepţie. Ea se adaugă întregului set de gene virale şi virionii transductori nu sunt defectivi pentru ciclul de multiplicare. Deleţia genei *v-src* nu influenţează capacitatea de multiplicare a VSR.

Fenomenul transducţiei este un eveniment rar. Virusurile transductoare nu pot fi considerate ca agenţi infecţioşi naturali, ci ca accidente ale ciclului de multiplicare, deoarece virionii transductori sunt defectivi.

Oncogenele de origine celulară sunt transduse sub forma unei copii de ARN. Un virus transduce *o singură genă*, rareori două. Genele *onc* transduse de retravirusuri sunt cei mai eficienți agenți ai transformării maligne (fig. 445, 446).

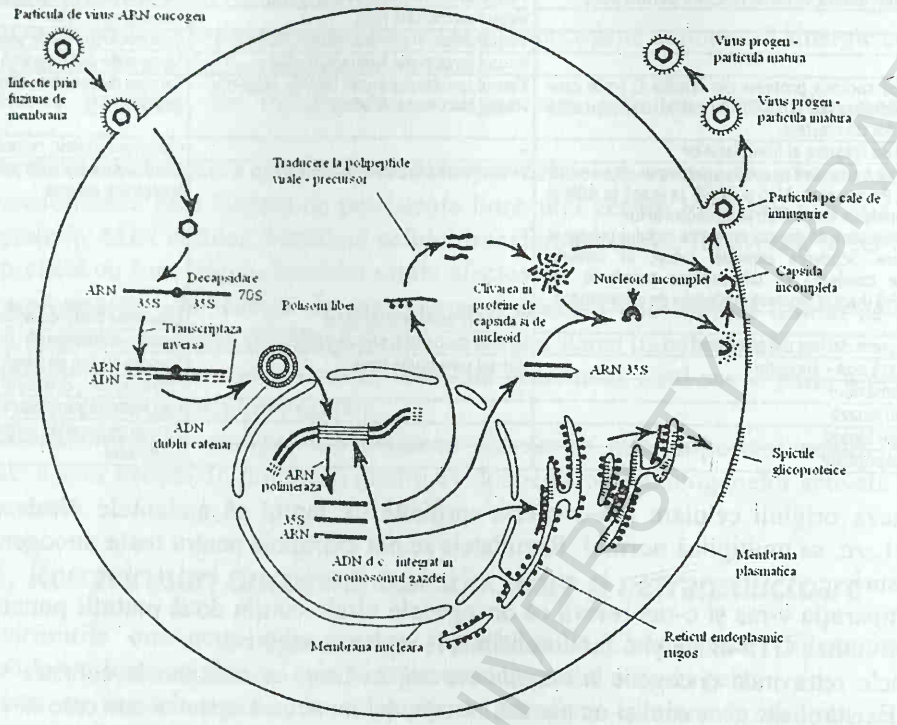


Fig. 445. Reprezentarea schematică a principalelor etape ale ciclului de multiplicare a virusurilor tumorale ARN.

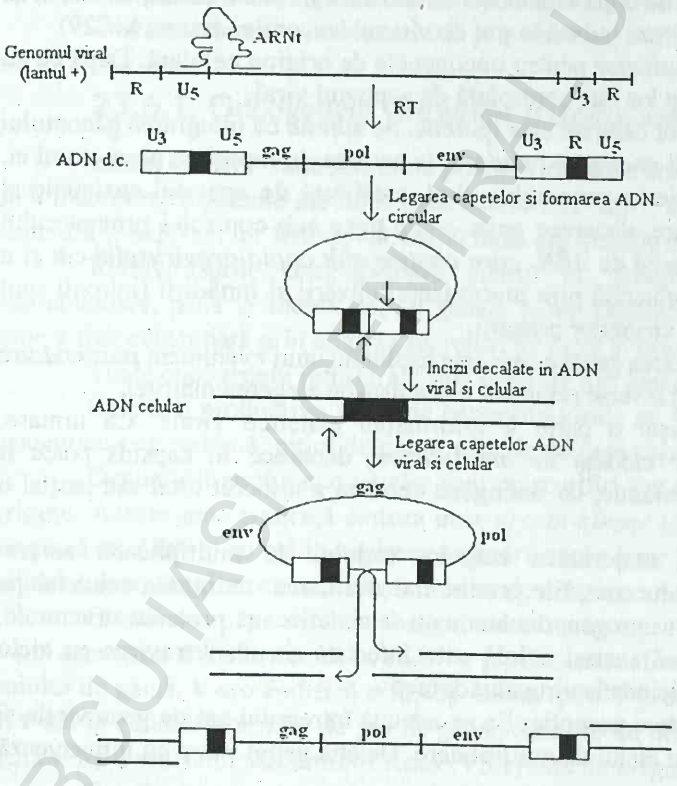


Fig. 446. Ilustrarea schematică a mecanismului molecular al integrării ADN viral într-un cromosom al celulei (după Coffin, 1991).

Oncogenele de origine celulară s-au găsit numai la subfamilia *Oncovirinae*, dar lipsesc la *Lentivirinae* şi *Spumavirinae*, deşi treptele multiplicării sunt aceleaşi.

23.6.2. Mecanismele oncogenezei cu retravirusuri

Mecanismele posibile ale transformării maligne sub acțiunea retravirusurilor transductoare, sunt multiple.

1) În acord cu *teoria supradozajului*, transformarea malignă este rezultatul *sintezei în exces a oncoproteinelor* codificate de genele transduse. Eficiența transformantă a retravirusurilor transductoare, derivă din faptul că genele *v-onc*, fiind sub controlul promotorului viral, sunt transcrise cu o rată superioară, comparativ cu genele *c-onc*. Dacă oncogena celulară codifică un factor stimulator al sintezei ADN, creșterea ratei diviziunii celulare este prima treaptă spre transformarea malignă.

2) *Captarea a 2 gene v-onc* în același provirus: cele *6 gene v-onc – myc, myb, mil(raf), ets, erbA, erbB* – sunt fiecare în parte, transformante, dar asocierea lor într-un singur genom viral amplifică starea de transformare apreciată prin caracterele fiziologice ale celulelor.

3) *Sinteza oncoproteinelor modificate*. In celulele normale ale mușchiului pectoral de găină, gena *c-src* codifică *tirozin-kinaza*, o fosfoproteină de 60 kDa, care se inseră în membrana citoplasmatică, cu rolul de a fosforila resturile de tirozină ale câtorva proteine din categoria *integrinelor*. Proteinele tirozin-fosforilate, în celula normală, au rolul de a lega Ca^{2+} și funcționează ca receptori pentru fibronectină. Activitatea tirozin-kinazei codificată de *c-src* este de numai 10% din aceea a enzimei codificată de gena v-src.

Gena *v-src* codifică o tirozin-kinază ușor modificată față de tirozin-kinaza codificată de gena *c-src*: ultimii 19 aminoacizi ai capătului C-terminal al proteinei *C-src* sunt înlocuiți cu o secvență de 12 aminoacizi în proteina *V-src*. Modificarea are consecințe asupra efectului sau reglator, dar gena *v-src* este transcrisă cu o rată net superioară, fiind sub controlul promotorului viral.

4) *Modificarea poziției genei* este unul dintre mecanismele prin care o genă celulară transdusă devine oncogenă. Studiile pe celule tumorale animale și umane au arătat că expresia genei *myc* este activată prin 3 mecanisme:

- inserția provirusului;
- amplificare genică;
- translocație cromosomală. Toate cele 3 mecanisme duc la creșterea sintezei proteinei *Myc*. În tumorile umane, activarea genei este rezultatul amplificării genice și translocației cromosomale.

Câteva carcinoame pulmonare cu celule mici, carcinomul de sân, de cervix și neuroblastoma au o genă *myc* amplificată. In limfomul Burkitt, translocația între cromosomii 8 și 14 duce la juxtapoziția oncogenei c-myc cu secvențele reglatoare ale sintezei Ig. Genele reglatoare ale sintezei Ig induc transcrierea cu o rată înaltă a ARNm din genele codificatoare ale limfocitelor B. Dacă gena c-myc este plasată (prin translocație) sub controlul genelor reglatoare ale sintezei Ig, limfocitul B produce cantități mari de ARNm c-myc (în locul ARNm pentru Ig) și celula este convertită la fenotipul malign.

5) *Activarea unei gene c-onc* sub acțiunea unei proteine virale: proteina virală acționează ca un mitogen.

Oncogeneza cu retravirusuri netransductoare. Multe retravirusuri care nu transduc oncogene celulare, induc tumori după inoculare experimentală la animale: sarcoame, leucemii, carcinoame. Diferența majoră față de virusurile oncogene transductoare, constă în perioada de latență care precede apariția tumorilor: de la câteva săptămîni, la câteva luni (transformarea cronică). Transformarea cronică este un eveniment rar (1 celulă transformată din 10^{10}–10^{15} celule). Nici unul dintre virusurile netransductoare nu induce transformarea malignă a celulelor *in vitro*. Cel mai cunoscut reprezentant al acestui grup este *virusul leucozei aviare*. Tumorile induse de retravirusurile netransductoare au câteva proprietăți definitorii:

- toate celulele unei tumori conțin genomul integrat ca provirus;
- provirusul este integrat în același situs cromosomal, în toate celulele tumorii;
- celulele tumorii sunt mono- sau *oligoclonale* (identice din punct de vedere genetic), având originea într-o singură celulă sau un număr foarte mic de celule transformate.

Integrarea provirusului se face la situsuri specifice ale unui cromosom, în imediata vecinătate a oncogenelor celulare, ca și genomul virusurilor transductoare. Consecința directă a integrării genomului viral este *mutageneza prin inserție*, deoarece LTR sunt promotori foarte eficienți. Genomul retraviral fiind integrat în genomul celular la un situs aleatoriu, LTR poate să inducă expresia la un nivel superior a protooncogenelor celulare, consecința fiind transformarea malignă.

Integrarea genomului viral este *mutagenă*, deoarece modifică secvența de baze ADN. Mutațiile induse în oncogenele celulare pot avea două efecte: stimulează activitatea unei gene sau o inactivează.

Modificarea activității oncogenelor celulare constituie esența mecanismului molecular al transformării maligne și a fost explicată prin mai multe teorii:

1) *teoria supradozajului* consideră că transformarea malignă este rezultatul stimulării activității unei oncogene și a sintezei în exces a oncoproteinei pe care o codifică. Gena *c-onc* din proximitatea situsului de integrare a provirusului trece în subordinea *promotorului viral* și va fi transcrisă cu o rată superioară celei normale. Oncoproteina corespunzătoare se sintetizează în exces, are acțiune stimulatoare și activează necontrolat rata diviziunii celulare;

2) *teoria activării genelor c-onc* sub acțiunea inductoare a provirusului consideră că genele *c-onc*, în mod obișnuit sunt parțial sau total represate, dar se activează după integrarea provirusului în imediata lor vecinătate. Se sintetizează oncoproteine, inductoare ale transformării maligne. Acesta este fenomenul *activării prin inserție* sau al *cis-activării oncogenelor celulare*, consecutiv trecerii lor sub controlul promotorului viral;

3) *reorganizarea proceselor celulare* de transcriere de către o proteină virală transactivatoare: transactivarea este ilustrată de HTLV I, care produce leucemia celulelor TCD_4^+ la adult (ATL). Este o malignitate care apare la 0,1 – 1% dintre cei infectați, după o perioadă lungă de latență. Mecanismul transformării este diferit: provirusul este integrat la situsuri nespecifice în genomul celulei, iar HTLV nu are oncogenă proprie. Virusul codifică o proteină (Tax), capabilă să transforme celulele limfoide și nelimfoide. *Tax* are rolul de a transactiva gene celulare implicate în controlul diviziunii limfocitelor T, prin interacțiunea directă sau indirectă cu factori de transcriere celulară: gena pentru sinteza IL-2, a IL-2R, precum și protooncogene (*c-sis, c-fos*).

4) *inactivarea antioncogenelor* este un alt efect al mutagenezei prin inserție. *Antioncogenele* sunt inactivatoare ale protooncogenelor. Ele codifică proteine *supresoare ale protooncogenelor* celulare, al căror rol este menținerea funcțiilor normale ale celulei. De exemplu, retinoblastomul (o tumoră retiniană ce apare la vârsta copilăriei) se datorează pierderii ambelor copii ale genei *rb*. Fosfoproteina *RB*, cu localizare nucleară, are rol important în reglarea ciclului celular, controlând intrarea celulei în ciclul mitotic. Absența proteinei *RB*, are ca efect proliferarea necontrolată a celulelor retiniene.

Gena p-53, supresoare a oncogenelor poate fi inactivată prin inserția unui provirus la ambele alele, sau prin combinarea unui eveniment de inserție, cu pierderea celeilalte alele prin deleție.

Genele *c-onc* se pot activa independent de infecția virală sub acțiunea *mutațiilor*, chiar *punctiforme*, care apar în interiorul lor. Substituția unui singur aminoacid al oncoproteinei este suficientă pentru a converti o oncoproteină reglatoare, într-o proteină cu caracter transformant.

Activarea oncogenelor ar putea fi rezultatul *translocației unei protooncogene* într-o nouă localizare cromosomală. De exemplu, în celulele limfomului Burkitt, schimbul de fragmente între cromosomii perechilor 8 și 14 are o frecvență de 90%. Schimbul între cromosomii perechilor 8 și 2, ca și între perechile 8 și 22 are o frecvență de 5%. In toate cazurile are loc translocația unui fragment al unui cromosom din perechea 8. Acest fragment conține protooncogena *c-myc*, care astfel este translocată adiacent față de o genă reglatoare a sintezei anticorpilor. In noua localizare a genei, oncoproteina *c-myc* este sintetizată în exces.

Oncogenele celulare mediază transformarea malignă indusă de virusuri, dar și de factorii fizici și chimici cu acțiune mutagenă.

Infecțiile cu retravirusuri potențial oncogene, la om și animale sunt mult mai frecvente decât incidența tumorilor. Pentru ca transformarea malignă a celulei să se producă, este necesar ca simultan cu infecția virală, să acționeze alți factori cu efect sinergic, denumiți factori *co-carcinogeni*. Aceștia pot fi factori intrinseci (genetici, hormonali, imunologici) sau factori ai mediului extern (substanțe chimice potențial cancerigene, radiații). Factorii co-carcinogeni interni sau externi potențează evoluția spre malignizare a infecției cu virusuri oncogene.

Virusurile leucemice. Leucemiile pot fi produse de virusuri atât la om (leucemia celulelor T la adult), cât și la animale (șoarece, păsări, pisică, cornute). Virusurile leucemice sunt netransductoare și produc transformarea cronică, după o lungă perioadă de latență. Oncogenitatea lor se datorează stării integrate în genomul celulei țintă (virusul leucozei aviare -ALV, virusul leucemiei murine Moloney – MoLV) sau activității proteinelor transactivatoare, care activează intens ciclul de multiplicare virală, dar în același timp perturbă mecanismele reglatoare ale diviziunii celulei și/sau diferențierea lor (HTLV I, virusul leucemiei bovinelor).

În transformarea acută produsă de virusurile transductoare, activarea întregii cascade este un proces de scurtă durată. Apariția leucemiei la om și animale este un proces multistadial, deoarece virusurile care produc transformarea cronică, se presupune că influențează determinanți minori ai procesului neoplazic și de aceea este necesară o stimulare cronică înainte de apariția leucemiei.

Bibliografie

Lowy D. R. 1985. Transformation and Oncogenesis: Retroviruses, în vol. Virology, edited by B. N. Fields et al., Raven Press, New York.

Neil J. C., Wyke J. A. 1998. Viral Oncogenicity, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Benjamin T., Vogt P. K. 1991. Cell Transformation by Viruses, în vol. Fundamental Virology, sec. Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Nevins J. R., Vogt P. K. 1996. Cell Transformation by Viruses, în vol. Fields Virology, third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

23.8. Dezoxiribovirusuri oncogene

Un număr mare de virusuri cu genom ADN, infecțioase în condiții naturale pentru o largă varietate de specii animale și pentru om, au capacitatea de a induce transformarea malignă a celulelor *in vitro* sau să inducă tumori la animalele de laborator. Unele determină formarea tumorilor chiar la gazdele lor naturale.

Virusurile oncogene ADN cuprind:

1) *Papilomavirusuri* (peste 60 de serotipuri izolate de la om și numeroase serotipuri animale);

2) *Poliomavirusuri* (SV_{40}, virusul polioma murin și virusurile umane BK și JC);

3) *Adenovirusuri* (cu numeroase variante antigenice umane și animale);

4) *Herpesvirusuri* (virusul Epstein-Barr, virusul bolii Marek, al carcinomului renal Lucke al broaștei leopard);

5) *Virusurile hepatitice* (virusul hepatitei B umane).

Efectul transformat rezidă în capacitatea de diviziune a celulelor, iar dacă nu se divid sau se află în faza G_0, virusurile tumorale ADN induc intrarea celulelor în faza S.

Papilomavirusurile induc carcinomul cervixului uterin, virusul Epstein-Barr induce limfomul Burkitt și carcinomul nazofaringian, iar virusul hepatitei B este asociat cu carcinomul hepatocelular. Polioma și adenovirusurile au activitate transformantă numai în sistemele experimentale *in vitro*, dar rolul lor în inducerea tumorilor umane sau animale nu s-a demonstrat.

Toate virusurile oncogene ADN au simetrie icozaedrică, cu dimensiuni cuprinse între 40-100 nm și sunt nude, cu excepția herpesvirusurilor.

Spre deosebire de retravirusuri, la care oncogenele sunt de origine celulară, genele transformante ale oncodnavirusurilor sunt *gene virale esențiale* pentru desfășurarea ciclului de multiplicare virală. Ele nu au corespondență printre genele celulare normale. Genele virale oncogene (transformante) au fost caracterizate prin evidențierea rolului lor în ciclul multiplicării acestor virusuri.

Transformarea malignă cu oncodnavirusuri nu este asociată cu producerea virusului progen, deoarece transcrierea programului tardiv este blocată.

Cercetările de genetică moleculară au evidențiat că genomul virusurilor oncogene ADN, din punct de vedere funcțional, poate fi împărțit în mod convențional, în două regiuni distincte, în raport cu momentul transcrierii lor:

a) *gene timpurii*, a căror transcriere precede replicarea ADN;

b) *gene tardive*, transcrise după replicarea genomului viral.

Pornind de la aceste concluzii, s-a dedus că interacțiunea oncodnavirusurilor cu celula, este modulată genetic pe două căi distincte:

În *celulele permisive* sunt transcrise ambele programe genetice. Se sintetizează molecule de ARNm timpurii și tardive, care sunt traduse în proteine virale. Ciclul multiplicării virale este complet. Infecția ete productivă: se asamblează și se eliberează virus progen, iar celula se lizează.

În *celulele nepermisive*, este transcrisă informația genetică *timpurie* și numai parțial, programul tardiv al genomului viral. Celulele nepermisive provin de la organisme sau din țesuturi pe care virusul nu le infectează în condiții naturale.

După transcrierea strict limitată a informației genetice, un factor celular blochează transcrierea celorlalte gene ale programului tardiv. Ciclul multiplicării virale este stopat înainte de replicarea genomului și nu se asamblează virus progen. Genomul viral este degradat ori se diluează prin diviziunea celulelor. Rezultatul interacțiunii virusului cu celula nepermisivă, de cele mai multe ori, este *infecția abortivă**, fără consecințe detectabile.

* În infecția abortivă virusul progen nu este produs, pentru că substratul este nepermisiv, adică nu suportă expresia programului genetic viral sau pentru că virionii infecțioși sunt defectivi.

Dacă genomul viral persistă în stare fizic *independentă* sau *integrată* într-un cromosom al celulei, are loc *transformarea malignă*. Oncogenele virale codifică proteinele necesare permanent pentru menținerea fenotipului transformant al celulei.

ADN viral se poate integra în ADN celular, *la un situs specific sau la un situs aleatoriu.* Integrarea la situs specific este probabil condiționată de *proteine virale* care recunosc o secvență a ADN celular, dar nu par a avea rol în procesul fizic al integrării. Integrarea ADN viral nu are rol în propagarea virusului, nefiind o treaptă obligatorie a multiplicării virale. După pierderea genomului viral, celula reversează la starea normală.

Transformarea *malignă* cu virusuri oncogene ADN este un eveniment rar (sub $1/10^5$) și necesită un mare număr de particule virale infecțioase/celulă. Ineficiența procesului de transformare, reflectă absența mecanismelor specifice de integrare a ADN viral în cromosomii celulei. Genele virale oncogene au o probabilitate mică să fie integrate într-o stare care să permită transcrierea.

Mult mai frecventă este *transformarea abortivă*, caz în care infecția celulelor nepermisive este urmată de exprimarea genelor timpurii. Tranzitoriu, celula dobândește caractere care denotă procesul de transformare, dar ulterior, după pierderea ADN viral, reversează la fenotipul normal și ADN viral se pierde.

Condiția transformării maligne este păstrarea genomului viral în celulă în stare integrată sau fizic autonomă și întreruperea transcrierii genelor virale tardive.

Consecințele majore ale integrării genomului viral sunt cele *mutagene* și se manifestă prin următoarele evenimente:

1) *inactivarea genei* celulare, ca rezultat al integrării genomului viral în secvența ei sau datorită *separării* genei de promotorul ei. Dacă gena are un rol reglator, consecința este perturbarea proceselor celulare dependente de gena inactivată;

2) integrarea poate să pună o genă a celulei sub controlul unui *promotor viral* mult mai activ și rezultatul este o supraproducție a proteinei codificată de o genă;

3) integrarea genomului viral poate să provoace *ruperea unui cromosom* celular și rearanjarea lui, astfel încât poate altera expresia genelor;

4) *unul sau mai multe produse ale genelor virale* pot, direct sau indirect, să determine transformarea. Oncoproteinele codificate de oncogenele virale formează complexe cu proteinele celulare normale și le alterează funcțiile, *stimulând celulele aflate în faza G_o să intre în ciclul celular.* Stimularea ratei activității mitotice a celulelor este prima treaptă a transformării maligne. Acțiunea oncoproteinelor este în acord cu ipoteza supradozajului.

Virusurile oncogene se deosebesc de fagii lizogeni prin faptul ca *nu codifică represori*, astfel încât transcrierea ADN viral integrat se face continuu. Bacteriofagul integrat necesită sinteza unui *represor* propriu pentru menținerea stării lizogene, pentru a preveni activarea funcțiilor virale, ce produc liza bacteriei. La retravirusuri, represorul nu este necesar, deoarece celula transformată este concomitent producătoare de particule virale progene. La oncodnavirusuri, genele transformante aparțin programului timpuriu și transcrierea lor este permanentă, fiind necesară pentru menținerea stării transformate. De aceea, nu este necesară sinteza represorului.

Detectarea ADN integrat. In studiul interacțiunii transformante virus-celulă se urmărește detectarea ADN viral, integrat sau în stare fizic autonomă, numărul și localizarea secvențelor de ADN viral, în celula transformată.

Dovada concludentă a prezenței ADN viral în celulele transformate este adusă de experiențele de hibridare prin metoda *Southern blotting* (ADN este în gel, iar ARN marcat, cu secvența cunoscută, este utilizat ca probă). ARN marcat (radioactiv sau cu digoxigenină), obținut prin transcrierea *in vitro* a ADN viral (polioma, SV_{40} etc.) hibridează cu ADN izolat din celulele transformate cu virusul corespunzător, dar nu hibridează cu ADN izolat din celulele normale.

ADN viral se poate integra sau rămâne sub formă fizic independentă în celulele transformate malign.

Pentru hibridare, ADN din celulele transformate cu un oncodnavirus se purifică și se secționează la situsuri întâmplătoare. Rezultă fragmente cu un spectru larg al gr. mol., dar mai mari decât al ADN viral. Fragmentele sunt fracționate prin centrifugare zonală și fiecare fracție se testează pentru prezența ADN viral, prin denaturare și hibridare cu ARN viral marcat.

Fragmentele de ADN celular care conțin ADN viral integrat, pot avea dimensiuni foarte diferite. De aceea, ARN marcat (din probă) hibridează cu fragmente de ADN de orice dimensiuni.

Dacă ADN viral se găsește în celulă în stare fizică autonomă, toate copiile sale sedimentează unitar, datorită uniformității masei moleculare a copiilor.

Pentru SV_{40}, ADN integrat în ADN celular s-a identificat cu ADN viral denaturat, marcat cu P^{32}. Rezultatele au evidențiat că ADN de SV_{40} se integrează la un singur situs cromosomal, dar unele celule transformate conțin două secvențe de ADN viral, integrate la situsuri cromosomale diferite.

Experiențele de fuziune celulară, mediată de virusul Sendai, arată că genomul SV_{40} se integrează în mai multe situsuri diferite ale ADN celular, situsuri care se găsesc pe mai mulți cromosomi. Celulele umane și de șoarece, a căror fuziune este indusă de virusul Sendai, formează hibrizi instabili care pierd la întâmplare cromosomii umani, până ce rezultă linii stabile ce au setul complet de cromosomi de șoarece și numai câțiva cromosomi umani. Celulele normale de șoarece au fost fuzionate cu celule umane transformate cu SV_{40}. S-au obținut clone stabile, ce se aseamănă cu celulele de șoarece, dar sunt transformate. Cromosomii umani se disting ușor de cei de șoarece în metafază. Pe această cale, celulele murine transformate pot fi analizate pentru identificarea cromosomilor umani pe care îi conțin. Analiza mai multor clone de celule a sugerat ca ADN de SV_{40} este integrat în mai mulți cromosomi.

Structura ADN viral integrat. Integrarea genomului oncodnavirusurilor într-un cromosom celular nu este esențială pentru desfășurarea ciclului de multiplicare și se produce cu o rată scăzută. Integrarea ADN viral are cele mai mari șanse să se producă în celulele nepermisive. Deoarece ciclul multiplicării este stopat, nu există presiune selectivă pentru păstrarea tuturor secvențelor codificatoare ale genomului viral. In unele cazuri, s-a demonstrat ca integrarea este însoțită de pierderea informației genetice virale: se produc deleții și inversii.

Cazul extrem al pierderii informației genetice, s-a observat la adenovirusuri. Clonele celulare transformate conțin totdeauna ADN viral integrat, dar secvențele virale nu reprezintă niciodată o moleculă genomică virală întreagă. Diferitele clone celulare conțin secvențe virale diferite, dar totdeauna un segment de ADN genomic este prezent în celulele transformate. Aceasta denotă că o anumită genă sau un set de gene virale sunt esențiale pentru transformare.

23.8.1. Transformarea cu poliomavirusuri

Genul *Polioma* (denumirea reflectă capacitatea lor de a induce tumori cu localizări multiple la puii de rozătoare) include virusurile vacuolante (SV_{40}), virusul polioma murin și virusurile umane BK și JC.

Virionii *Polioma* (Pi) sunt nuzi, au simetrie icozaedrică, cu diametrul de 45 nm, genom ADN dc, de 4,7–5,2 kb.

Virusul polioma murin este endemic la șoarecele de laborator și la cel sălbatic, la care produce infecții persistente ale celulelor epiteliale neciliate ale bronhiilor și bronhiolelor. Infecția cu Pi este inaparentă și persistentă. Virusul s-a găsit în diferite organe și în excreta. Tractul urinar pare a fi sursa persistenței și răspândirii virusului prin urină în populațiile de șoareci. Ciclul de multiplicare este litic și se eliberează virus progen. Virusul Pi s-a găsit și la șobolan, iar la păsări produce numai infecții acute. In condiții naturale, Pi produce tumori cu o rată scăzută.

Multiplicarea Pi este dependentă de gradul de diferențiere celulară.

Funcțional, genomul cuprinde setul de gene timpurii și al genelor tardive. In *celulele permisive* sunt transcrise ambele programe, iar în cele nepermisive sau semipermisive este transcris numai setul de gene al programului timpuriu, codificatoare pentru *antigenele T* (*T*umorale). Antigenele T sunt proteine oncogene, stimulatoare ale sintezei ADN celular, o condiție preliminară a intrării celulei în faza S și a transformării maligne, dar și a ciclului de multiplicare litică.

BCU CLUJ / CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Virusul simian 40 (SV_{40}), în condiții naturale, infectează persistent, rinichiul* maimuțelor de *Cercopithecus aetiops* și *Macaccus rhesus*, fără manifestări clinice.

* Culturile celulare de rinichi de *M. rhesus* au fost folosite pentru producerea vaccinului polio. Zeci de milioane de copii au primit SV_{40} cu titru mic sau mare, odată cu vaccinul polio. Ulterior s-a descoperit că SV_{40} induce tumori la puii de rozătoare și se suspectează rolul său în inducerea unor tumori umane.

Datele recente de PCR sugerează un rol posibil al lui SV_{40} în inducerea mezoteliomului*, osteosarcomului, a tumorilor de plex coroid și altor tumori ale creierului.

* Mezoteliomul este o tumoră care apare difuz pe suprafețele pleurale. Expunerea la pulberea de azbest și efectul sinergic al fumatului sunt factori majori de risc pentru această tumoră. Latența este lungă (circa 20 de ani) și constituie o problemă de sănătate publică.

Virusurile Pi și SV_{40} codifică sinteza antigenelor T, proteine multifuncționale. ARNpm transcris din gena codificatoare a SV_{40} este sudat diferit și rezultă două molecule de ARNm traduse în Ag T și t. Ag T este format din 708 aminoacizi, iar Ag t are ultimii 82 aminoacizi ai Ag T și 97 aminoacizi codificați de o secvență intronică a genei codificatoare. Ag T suferă modificări post-traducere, ce include acilarea, glicozilarea, ribozilarea, adenilarea, fosforilarea. Modificările modulează activitatea și distribuția proteinei în celulă. Antigenul T este format din câteva domenii funcționale. Unul dintre domenii se leagă cu molecula de ADN, în special monocatenar. Secvența de legare separă promotorii ce controlează genele timpurii de promotorii celor târzii. Alt domeniu al moleculei T are activitate ATP-azică, stimulată după legarea a ADN mc. După legarea ATP, Ag T se organizează în structuri supramoleculare hexamerice. Hexamerul funcționează ca helicază a ADN, enzimă ce despiralizează ADN.

Antigenul T de 100 kDa are o localizare aproape exclusiv *nucleară*, atât în celulele infectate, cât și în cele transformate. Proteina se asociază cu ADN viral și reglează câteva trepte cheie ale ciclului de multiplicare: transcrierea ARNm timpuriu și tardiv, replicarea ADN. Antigenul viral se asociază și cu *proteina p53* – o fosfoproteină nucleară, cu rol inhibitor al diviziunii celulare și cu *Rb* și formează complexe inactive. Astfel, p53 și Rb își pierd funcția inhibitorie a progresiei ciclului celular, favorizând intrarea celulei în faza S a ciclului celular și replicarea ADN viral. Inactivarea funcției proteinelor codificate de GST este esențială pentru transformarea mediată de virus. Antigenul T induce expresia câtorva factori necesari pentru progresia ciclului celular: ciclina A, B etc.

Antigenul T de 55 kDa (mijlociu) este o proteină fosforilată, care se asociază cu proteina celulară de 60 kDa (p60), codificată de protooncogena *c-src*, o kinază tirozin-specifică. Interacțiunea *p60* cu antigenul viral, determină o stimulare de circa 50 de ori a activității tirozin-kinazice a proteinei *Src* și concomitent, perturbarea mecanismului său de reglare negativă.

Antigenul t nu este necesar pentru multiplicarea virală, dar stimulează sinteza ADN, este necesar pentru transformarea eficientă a celulelor oprite în ciclul de creștere și stimulează intrarea celulei în faza S.

Menținerea stării transformate necesită sinteza continuă a proteinelor virale T.

În celulele transformate, setul genelor tardive nu este transcris și celulele nu produc virus progen.

SV_{40} și Pi, după inoculare experimentală, induc tumori cu localizări multiple la puii nou născuți de șoarece, de hamster, de șobolan sau *in vitro* transformă celulele lor.

Genomul viral, de obicei, este integrat în ADN celular.

Poliomavirusurile BK și *JC** (inițialele numelor pacienților) infectează timpuriu în copilărie și sunt ubicvitare în populația umană. Sunt virusuri mici (diametrul de 40 nm), nude.

Capsida, cu simetrie icozaedrică, este alcătuită din 360 molecule de VP 1 distribuite în 72 de capsomere pentamerice. Fiecare capsomeră conține 5 molecule de VP 1 (360 : 72 = 5) și o moleculă de VP 2 sau VP 3.

* Virusul JC s-a izolat în 1971 din creierul unui pacient cu *leucoencefalopatie multifocală progresivă* (LMP), o maladie neurodegenerativă. BKV s-a descoperit în sedimentul urinar al unui pacient cu transplant renal și are tropism pentru epiteliul tractului urinar: infectează epiteliul calicelor renale, al pelvisului renal, al ureterelor și vezicii urinare, prostata. Se cultivă în culturile de rinichi embrionar, amnios. Cele două virusuri sunt diferite și aglutinează hematiile de grup 0.

Receptorii celulari pentru BKV şi JCV sunt resturile de acid sialic, deoarece tratamentul eritrocitelor cu neuraminidază anulează efectul hemaglutinant. JCV se multiplică în cultura primară de celule gliale fetale umane, bogate în spongioblaste, precursoare ale oligodendrocitelor. Celulele gliale ale fătului uman sunt greu disponbile: o linie celulară glială s-a obţinut prin imortalizarea astrocitelor cu ADN de SV_{40} defectiv pentru multiplicare, care exprimă proteina T la nivel crescut.

Ciclul de multiplicare poate fi divizat în 3 faze. În faza precoce sunt transcrise genele timpurii, codificatoare ale proteinelor T cu rol reglator. În faza a II este iniţiată replicarea ADN viral. Curând după iniţierea replicării ADN, urmează faza tardivă, în care este transcris ARNm tardiv. Se sintetizează proteinele virale şi se asamblează virioni progeni. Genele tardive se exprimă eficient numai după replicarea ADN, dar cele timpurii continuă să se exprime şi în stadiul tardiv şi codifică factorii de transcriere.

Pi umane au tropism pentru celulele diferenţiate, în repaus. Antigenele T stimulează intrarea celulei în faza S a ciclului celular, consecinţa fiind uneori, transformarea malignă a celulei.

Infecţia cu JCV se produce, la majoritatea indivizilor (circa 90%), în primele 2 decade de viaţă. Nu este cunoscută poarta de intrare a virusului şi nici celulele în care virusul se multiplică iniţial. Infecţia primară este asimptomatică. Ambele virusuri infectează persistent rinichiul şi ţesutul limfoid al persoanelor sănătoase. Infecţia rămâne latentă şi se activează în condiţiile *imunosupresiei* prelungite (transplant, sarcină, îmbătrânire). Reactivarea procesului infecţios şi eliminarea virusului în urină sunt asimptomatice la imunocompetenţi. La persoanele imunosupresate, în special cu depresia IMC, JCV dobândeşte acces la SNC şi produce o maladie demielinizantă, *leucoencefalopatia multifocală progresivă* (LMP) umană, o maladie *neurodegenerativă* demielinizantă letală a creierului. JCV infectează oligodendrocitele (celulele care mielinizează axonii) şi produce demielinizare multifocală. Consecinţa indirectă este necroza neuronilor, pentru că supravieţuirea lor este dependentă de oligodendrocite. Demielinizarea este un proces multifocal, cu localizări multiple: în emisferele cerebrale, corpii striaţi, talamus, cerebel, trunchiul cerebral. Pacienţii cu LMP par să aibă deficienţă a IMC şi au frecvent tumori limfatice. Majoritatea sunt pacienţi SIDA.

Macrofagele pline cu lipide migrează frecvent în ariile demielinizate, pentru a fagocita resturile de mielină degradată. Pe măsura progresiei procesului patologic, ariile demielinizate devin confluente şi devin vizibile la examinarea secţiunilor cu lupa.

LMP progresează la stadiul letal în 4-6 luni, deşi uneori semnele clinice şi simptomele rămân stabile o lungă perioadă de timp. Clinic, simptomele LMP la momentul prezentării sunt deficitul vizual, deficit motor şi mental (labilitate emoţională, slăbirea memoriei, demenţă).

LMP este singura maladie demielinizantă a creierului uman, al cărei agent etiologic este un virus. Diagnosticul LMP este imagistic, prin tomografie computerizată: leziunile de demielinizare apar în special în aria parieto-occipitală, la joncţiunea substanţei albe cu substanţa cenuşie a cortexului şi nu urmează distribuţia vasculară (Major şi colab., 1992). Metoda optimă pentru diagnosticul LMP este biopsia din creier. Prin hibridarea *in situ* pe materialul inclus în parafină sau pe secţiuni obţinute la criotom, s-a relevat prezenţa ADN-JCV în creierul pacienţilor. Metoda detectează celulele în care virusul se multiplică productiv, deoarece trebuie să fie prezente sute de copii ale genomului viral. Metoda imunocitochimică utilizează Ac anti-antigenul T şi anti-antigenele capsidei. In celulele pozitive pentru antigenele capsidei, transcrierea şi traducerea genomului viral sunt procese active, adică infecţia este productivă.

PCR poate fi utilă pentru diagnosticul LMP: ADN de JCV s-a detectat în biopsiile de creier, în LCR şi chiar în limfocitele circulante ale pacienţilor LMP.

Celulele creierului pacienţilor cu LMP nu evidenţiază antigene virale. Sediul latenţei nu este creierul, dar ar putea fi *limfocitul B*, în măduva osoasă, deoarece IF cu AMC evidenţiază antigenul JCV. Virusul se disemineză în creier pe cale hematogenă, în condiţii imunodeficitare sau de imunosupresie. Leziunile demielinizante sunt multiple şi sunt localizate la joncţiunea substanţei albe cu substanţa cenuşie, unde se găsesc arteriolele terminale ale arborelui cerebrovascular, ceea ce susţine ipoteza diseminării hematogene. Virusul s-a detectat în urina pacienţilor cu LMP şi cu transplant renal, precum şi la femeile gravide, ceea ce sugerează că sediul *latenţei ar fi tractul urogenital.*

Infecţia primară nu este asociată cu manifestări clinice. Înainte de era SIDA, incidenţa LMP era maximă la pacienţii în cea de a 6-a decadă de viaţă, ceea ce sugerează că infecţia are loc în primele

2 decade, virusul rămâne latent şi se activează la cei care fac LMP. Majoritatea pacienţilor LMP au deficit al IMC, ceea ce ar favoriza reactivarea infecţiei. După '80, numărul cazurilor LMP a crescut datorită epidemiei HIV. Majoritatea pacienţilor LMP au SIDA.

Limfocitul B de memorie ar fi substratul celular adecvat pentru latenţa JCV, datorită absenţei factorilor de transcriere, dar genomul viral poate fi activat odată cu reactivarea limfocitului de memorie. Limfocitele de memorie reactivate ar traversa bariera sânge creier în absenţa Ag specific, mediind diseminarea virusului.

Virusul BK şi rareori virusul JC produc infecţii hemoragice (cistită) ale tractului urinar la pacienţii transplantaţi.

Cele două virusuri, inoculate intracerebral şi subcutan la puii de hamster, produc tumori gliale şi alte tumori neclasificate. Transformarea este consecinţa unei infecţii *neproductive* sau *abortive*.

Potenţialul oncogen. JCV, BKV şi SV_{40} induc tumori după inoculare la animalele de laborator şi transformă celulele lor *in vitro*. Tipul tumorii depinde de specie, vârsta şi situsul inoculării.

Curând după infecţia virală, atât în celulele permisive, cât şi în cele nepermisive, are loc creşterea accentuată a enzimelor ce catalizează sinteza ADN. Creşterea este detectabilă chiar în celulele blocate în faza G_1 (fază în care sinteza ADN este stopată). Enzimele iniţiază nu numai sinteza ADN viral, ci şi sinteza ADN celular.

Expresia Ag *LT* (Large T) poate duce la transformarea malignă a celulei. Ag *t* asistă transformarea unor tipuri de celule, iar alteori sinteza sa este suficientă pentru a induce fenotipul transformant.

Mecanismul transformării cu virusurile polioma pare a fi *'hit and run'*, adică expresia Ag LT este necesară pentru iniţierea procesului multistadial al transformării, dar nu mai este necesară după ce s-a atins un stadiu critic al transformării.

Alt mecanism prin care Ag LT polioma produce transformarea constă în inducerea alterărilor structurale ale cromosomilor: ruperi, lacune cromatidice (ruperea unei cromatide, cu păstrarea fragmentului în poziţia iniţială), cromosomi dicentrici şi inelari, deleţii, duplicaţii, translocaţii.

Mecanismul molecular al efectului clastogen (perturbarea mitozei cu formarea punţilor cromatice, cromosomi întârziaţi, minicromosomi) al Ag LT BKV s-ar datora capacităţii sale de a lega topoizomeraza I sau activităţii sale de helicază, prin care induce leziuni cromosomale în timpul despiralizării catenelor ADN celular. Deoarece Ag LT inactivează p53, celulele lezate supravieţuiesc şi creşte şansa transformării maligne. Activităţile clastogene şi mutagene ale Ag LT codificate de JCV şi BKV perturbă funcţia genelor care menţin stabilitatea genomului: oncogene, GST, genele pentru repararea leziunilor ADN.

Virusurile JC şi BK se cultivă cu mare dificultate, dar nu în scopul diagnosticului. Ambele pot fi detectate cu PCR, iar BKV se poate evidenţia pe imaginile electrono-optice, în urină. Testele serologice sunt inutile datorită nivelului înalt (80%) al contaminării populaţiei.

Căile de transmitere ale celor 2 virusuri nu se cunosc.

23.8.2. Transformarea cu papilomavirusuri

Papilomavirusurile – o familie mare, distribuite în 16 genuri, prezintă un interes ştiinţific şi practic deosebit, deoarece s-au izolat de la primate, bovine, iepurele de vizuină din vestul SUA şi de la diferite specii de păsări. Virionii sunt nuzi, cu diametrul de 55 nm şi simetrie icozaedrică.

Genomul papiloma este o moleculă de ADN dublu catenară, circulară închisă, de 7,2–8 kbp, asociat cu proteine histonice celulare şi formează o structură asemănătoare cromatinei. Informaţia genetică este transcrisă de pe o singură catenă şi este organizată în cel puţin 8 ORF.

Din punct de vedere funcţional, genomul poate fi împărţit în trei regiuni:
- regiunea necodificatoare (LRR – long regulatory region), conţine elementele reglatoare ale transcrierii şi replicării (10% din genom);
- regiunea transcrisă *timpuriu E* (*E*arly);
- regiunea transcrisă *tardiv* (L).

Virusurile Papiloma induc formarea tumorilor benigne (negi, veruci) pe tegument şi mucoase, care de obicei regresează, dar cel puţin 3 reprezentanţi au potenţial oncogen:

– virusul papilomului Shope;
– virusul fibropapilomului bovin;
– papilomavirusul tractului digestiv al bovinelor.

Virusurile *Papiloma* nu se multiplică în culturi de celule, cu excepția celor foarte specializate (culturi de keratinocite). *In vivo*, se multiplică în epiteliul squamos al mucoaselor și al epiteliilor keratinizate.

Majoritatea indivizilor sunt infectați cu papilomavirusurile (HPV1, 2, 3, 4) care produc negi, *tumori benigne epiteliale* și *fibroepiteliale* în copilărie și adolescență. Tumorile epiteliale denumite *papiloame** (negi, veruci) pot progresa uneori spre carcinoame, prin proliferare, după străpungerea membranei bazale.

*Originea virală a leziunilor papilomatoase a fost intuită de Ciufo (1907): filtratele acelulare ale negilor transmit leziunile. Primul virus al acestui grup a fost descoperit de Shope (1933) la iepurele de vizuină. Virusul produce o papilomatoză cutanată, care în 25% din cazuri, progresează la un carcinom celular squamos, evoluția malignă fiind accelerată de metilcolantren și de gudronul de cărbune. In condiții experimentale, virusul infectează și iepurele domestic, iar papiloamele progresează spre carcinom în proporție de 75%.

La om s-au identificat peste 106 de genotipuri de papilomavirusuri, notate *HPV* (*H*uman *P*apilloma *V*irus) urmat de o cifră. Creșterea rapidă a numărului de genotipuri identificate este rezultatul direct al utilizării tehnicii PCR. Numeroasele genotipuri se grupează după *gradul de omologie a nucleotidelor*. Cele 106 tipuri genomice au o omologie a nucleotidelor mai mică de 90%. In interiorul tipurilor, identitatea secvențelor cuprinsă între 90–98% corespunde *subtipurilor*, iar izolatele cu o identitate mai mare de 98% a nucleotidelor corespund *variantelor*.

HPV au specificitate înaltă de gazdă și tisulară. Omul nu este sensibil la PV aviare, iar HPV nu infectează alte specii. La bovine, maimuțe etc., s-au descris peste 20 de tipuri de papilomavirusuri. Unele produc *papiloame* (tumori benigne derivate din celulele epiteliale), altele produc *fibropapiloame* (tumori benigne formate din celule epiteliale și din țesut conjunctiv fibros) sau *fibroame* (tumori benigne formate din țesut conjunctiv fibros și fibroblaste proliferante).

Subgrupele de virusuri au tropisme pentru situsuri și țesuturi specifice. HPV infectează cheratinocitele, epiteliile cheratinizate și necheratinizate squamoase pluristratificate.

HPV mucotrope infectează în special tractul urogenital, dar pot infecta și cavitatea orală, laringele și produc leziuni recurente. Recurențele se datorează faptului că prin intervenția chirurgicală sunt extirpate leziunile vizibile, dar zonele învecinate pot să aibă celule infectate. Peste 30 de genotipuri formează un subgrup ce infectează celulele epiteliale ale tractului *anogenital*. Variantele ce infectează tractul genital* sunt de două categorii: de *risc mare* și de *risc scăzut*. Cele de risc scăzut (HPV-6 și 11) produc numai negi genitali benigni și infecția se transmite pe cale sexuală. Cele de risc mare (HPV-16, 18, 31, 33, 45) sunt asociate cu dezvoltarea tumorilor anogenitale. O țintă majoră a HPV oncogene genitale este epiteliul squamos la joncțiunea squamo-columnară a cervixului uterin. Aproape toate leziunile intraepiteliale precanceroase și ale carcinomului invaziv sunt originare în zona de tranziție. Intervalul între expunere și apariția leziunii este variabil: câteva săptămâni, câteva luni sau mai mult. Virusul pătruns în tractul genital feminin, ajunge prin microleziuni ale mucoasei, la celulele stratului bazal, care se divid. În aceste celule s-a evidențiat ADN și ARN viral. Genomul ADN poate să persiste perioade lungi în celulele stratului bazal, fără să producă modificări morfologice. Pe măsură ce celulele care conțin ADN viral ajung în straturile superioare ale epiteliului, ciclul de multiplicare este activat și se asamblează virioni progeni. Celulele infectate au nucleu mare, hipercromatic.

* Cele care infectează tractul genital sunt transmise pe cale sexuală. Se estimează că circa 2/3 dintre indivizii care au relații sexuale cu un partener infectat, se infectează. Majoritatea infecțiilor sunt subclinice. Infecțiile cu HPV de risc înalt nu sunt limitate la tractul genital, deoarece circa 20% din neoplaziile orofaringiene conțin ADN al HPV anogenitale.

Infecția tractului genital cu HPV poate produce inițial, leziuni ușoare (displazii) sau neoplazii cervicale intraepiteliale de *gradul I*, cu un grad mediu de alterare a diferențierii celulare. Multe celule sunt eliminate de sistemul imunitar în mai puțin de un an. Unele celule ale displaziilor nu sunt eliminate de sistemul imunitar și persistă perioade lungi, de câteva decade. Persistența infecției cu HPV de risc înalt constituie un factor major al dezvoltării malignităților genitale: carcinomul cu celule squamoase și mai rar, adenocarcinomul de col cervical.

HPV_1 şi HPV_4 produc negi plantari, iar HPV_2 produce negi ai mâinii, leziuni proliferative benigne. Alte 20 de tipuri infectează tegumentul pacienţilor cu *epidermodisplazie veruciformă* (EV), caracterizată prin verucoză extensivă. Pacienţii EV au leziuni maculare persistente, pe arii tegumentare extinse, ce tind să devină coalescente (confluente). La pacienţii cu EV s-a evidenţiat o relaţie directă între HPV şi neoplazia tegumentară: mulţi pacienţi EV fac carcinom tegumentar al celulelor squamoase, în special în zonele expuse la soare, ceea ce sugerează un efect co-carcinogen al luminii uv. ADN al HPV_5 persistă extracromosomal cu un număr mare de copii în peste 90% din tumori.

Ciclul de multiplicare. În virion, genomul ADN circular, dublu catenar, de 8 kbp, este asociat cu histone de origine celulară (H2a, H2b, H3, H4) şi formează complexe asemănătoare celor de cromatină. Genomul viral este transcris în 8 cadre de citire (ORF), exprimate în molecule de ARN policistronice ce codifică proteine timpurii şi tardive. Cadrele de citire se suprapun. Se sintetizează 5 proteine timpurii şi 3 tardive. Trei dintre proteinele timpurii (E_6, E_7 şi E_5) stimulează celula infectată să intre în faza S. E_6 şi E_7 perturbă controlul trecerii de la G_1 la faza S şi produc imortalizarea keratinocitelor. E6 se leagă cu p53 şi determină degradarea rapidă a acesteia pe calea ubiquitinei. E1 şi E2 controlează replicarea genomului HPV. E_4 interacţionează cu microfilamentele celulei şi determină colapsarea lor. Proteina L_1 este capsidală, iar L_2 are rol în asamblarea virionilor progeni.

La HPV de risc înalt, transcrierea copiilor este iniţiată la doi promotori virali: la cel *timpuriu* se iniţiază transcrierea *mesagerilor timpurii* şi este activ înainte de ciclul infecţios productiv. Pentru ciclul productiv este activat promotorul *tardiv*.

Propagarea HPV *în vitro* nu s-a realizat, deoarece ciclul de multiplicare este condiţionat de programul de diferenţiere al cheratinocitului şi prin natura lor, aceste celule nu cresc *in vitro*.

Papilomavirusurile au un tropism specific pentru celulele epiteliilor squamoase (epitelii cu celule aplatizate), cu rată înaltă de reînnoire, ce constau din *celule stem** nediferenţiate ale stratului bazal al epidermei.

Infecţia celulelor stratului bazal** este favorizată de leziunile şi microleziunile epiteliului tegumentar sau se produce la situsurile în care astfel de celule sunt în mod natural expuse la suprafaţă: la joncţiunea diferitelor tipuri de epitelii, ca de exemplu, *zona de tranzit a cervixului uterin* şi la *joncţiunea epiteliului laringian, cu cel respirator*. Receptorul celular pare a fi heparan-sulfatul. Celulele bazale infectate persistă până când sistemul imunitar le elimină sau, în absenţa efectorilor imunitari, câteva decade (fig. 447).

* Celula *stem, de origine* sau, *celula mamă* (*stem*, lb. engl. = tulpină) este nediferenţiată, cu potenţialitate înaltă de diviziune şi diferenţiere. Celulele rezultate prin diviziune se diferenţiază gradat şi dobândesc funcţiile tisulare specifice.

** Prin diviziunea celulei bazale, *rezultă două celule* cu evoluţie diferită: *una rămâne în stratul bazal* al epidermei şi continuă să se dividă, iar cealaltă intră în *stratul suprabazal*, nu se mai divide şi va fi împinsă spre suprafaţa epidermei, de alte celule fiice, trecând succesiv prin straturile spinos, granular şi cornos.

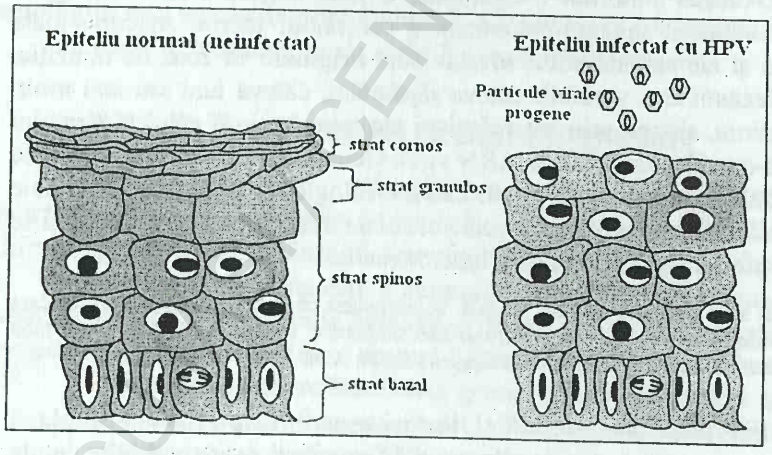


Fig. 447. Diferenţele structurale între epiteliul tegumentar normal (stânga) şi cel infectat cu HPV. În straturile superioare ale epiteliului normal, celulele îşi pierd nucleul, se aplatizează, mor şi se descuamează. Celulele infectate cu HPV ale unui neg rămân nucleate, viabile şi eliberează virioni progeni (după Longworth, 2004).

Latenţa

Celulele stratului bazal al epidermei sunt *nepermisive* şi infecţia este neproductivă. Multiplicarea virusului este complet represată. Genomul viral persistă, în special în stare fizic autonomă. Sunt transcrise într-o măsură limitată, numai *genele programului timpuriu* (E_1 şi E_2) ce catalizează replicarea

genomului. Aceste proteine formează un complex ce se leagă la secvența de origine a replicării ADN şi recrutează ADN-polimeraza celulară şi proteinele accesorii ale replicării. E_1 are şi activitate de *helicază*, permiţând separarea catenelor de ADN viral înaintea complexului de replicare.

Genomul viral este păstrat într-un *număr de 20–100 de copii ADN/celulă*, în stare autonomă, rezultate prin replicarea genomului virionului infectant. Numărul de copii este menţinut stabil în celulele bazale nediferenţiate, tot timpul infecţiei.

În *celulele stratului bazal*, virusurile papiloma realizează o infecţie *latentă* propriu-zisă. Genomul viral persistă, dar nu se sintetizează proteine virale tardive. In absenţa proteinelor virale, rata diviziunii celulare rămâne în limite fiziologice şi negul nu apare. Celulele stratului bazal pot să poarte mult timp genomul viral, înainte de apariţia negului.

Dezvoltarea verucilor

Papilomavirusurile umane sunt agenţii cauzatori ai negilor.

Negul poate să apară târziu după infecţie, în condiţii de imunosupresie sau sub acţiunea unor factori stimulatori ai sintezei proteinelor virale. Proteinele E_6 se asociază cu proteina antioncogenă p53 şi împreună cu ubiquitin-ligaza celulară formează un complex trimeric ce stimulează rata de turn-over a p53. E_7 se leagă cu proteine antioncogene ale familiei Rb. Simultan, proteinele virale stimulează *proliferarea celulelor* stratului bazal şi se formează *o tumoră benignă*. Deoarece celulele stratului se divid, genomul viral se distribuie în celulele fiice, dintre care una se detaşează din stratul bazal, migrează în stratul granular şi se diferenţiază (fig. 448).

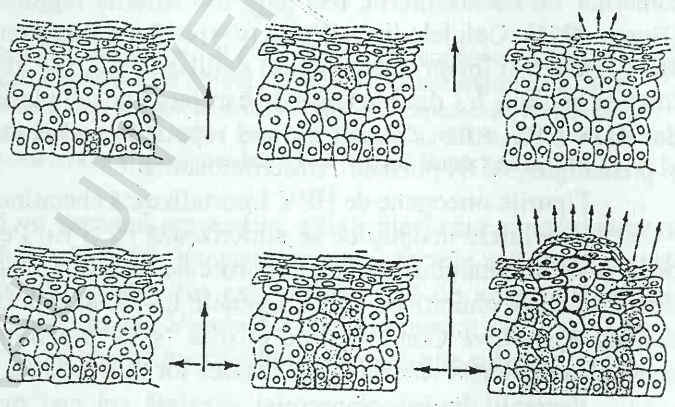


Fig. 448. Reprezentarea schematică a evenimentelor celulare consecutive infecţiei unei celule a stratului bazal cu HPV. În partea de sus, o celulă infectată se diferenţiază fără diviziuni, migrează în straturile superioare, poate produce virus şi poate fi eliminată. În partea de jos sunt reprezentate consecinţele obişnuite ale infecţiei cu HPV: celula stratului bazal, infectată printr-o microleziune, se divide, întârzie procesul de diferenţiere, formează un neg şi, eventual, celulele din straturile superioare ale leziunii produc virus (după Zur Hausen, 1994).

Celulele epiteliale normale, după ce părăsesc stratul bazal, ies din ciclul celular şi în straturile suprabazale, *pierd nucleul*, dar *celulele infectate*, după ce părăsesc stratul bazal, rămân active în ciclul celular. Oncoproteinele virale E_6 şi E_7 sunt necesare *imortalizării* cheratinocitelor şi uşurează menţinerea copiilor extracromosomale de HPV în celulele bazale nediferenţiate şi stimulează celulele diferenţiate să reintre în faza S. Sub acţiunea proteinei E_7, celulele diferenţiate din straturile suprabazale reintră în faza S şi activează expresia factorilor de diviziune celulară, necesari multiplicării virale. Prezenţa E_7 duce la menţinerea caracterului de *celule nucleate* în toate straturile celulare ale epiteliului infectat (Longworth, 2004).

O funcţie majoră a oncoproteinei E_6 la genotipurile cu risc oncogen înalt, este capacitatea de a activa expresia subunităţii catalitice a telomerazei hTERT*, importantă pentru imortalizarea celulei.

* Vezi capitolul *Noţiuni generale de oncogeneză.*

În cele mai multe tipuri de neoplazii are loc reactivarea expresiei hTERT şi restabilirea activităţii telomerazei.

E_7 este o oncoproteină formată din circa 100 de aminoacizi. În celulele infectate cu HPV de risc înalt este localizată predominant în nucleu şi se asociază cu proteinele familiei Rb ce cuprinde Rb, p 107 şi p 130. Aceste proteine se exprimă diferenţiat în ciclul celular: Rb se exprimă în toate fazele ciclului, p 107 în faza S, iar p 130 predomină în faza G_0.

Al III-lea grup de proteine cu care se asociază E_7 sunt histon-deacetilazele.

Țesutul negului este format din aceleași straturi de celule epiteliale, ca și epiderma, iar membrana bazală este intactă.

Programul multiplicării virale este strâns legat de *procesul de diferențiere* a celulelor epiteliilor squamoase. Există o corelație strânsă între stadiul de *keratinizare* a celulelor epiteliale și exprimarea *programului tardiv* al multiplicării virale. Se sintetizează proteinele L_1 și L_2, care se asamblează spontan în capside icozaedrice.

Virusul nu s-a putut propaga în culturi celulare, datorită dependenței de stadiul de cheratinizare. In straturile celulare profunde ale verucilor nu se găsesc virioni. Celulele negului devin permisive pentru multiplicarea virusului, pe măsură ce se diferențiază în cheratinocite, în straturile *spinos* și *granular*. Virionii se asamblează numai în celulele keratinizate.

După inițierea diferențierii celulare, marcată de începutul cheratinizării, se exprimă atât *genele timpurii*, cât și genele *programului tardiv*. In straturile spinos și granular se sintetizează proteinele capsidei, iar virionii se asamblează în *nucleu*. Particulele virale se eliberează prin descuamarea celulelor de la suprafața leziunii. Leziunile HPV sunt controlate de sistemul imunitar: în 2–3 ani sunt eliminate aproape toate infecțiile cu HPV.

Malignități induse de papilomavirusuri

Un subset al virusurilor papiloma este implicat în apariția *neoplaziile de cervix uterin* și a altor malignități anogenitale, precum și a unor *neoplazii tegumentare* la pacienții cu epidermo-displazie veruciformă. Neoplazia cervicală se dezvoltă lent, în ani sau chiar decade. Circa 99% din biopsiile tumorilor de cervix uterin, recoltate din diferite regiuni ale lumii conțin ADN de HPV_{16} și HPV_{18} (Bosch, 1995). Celulele liniei HeLa (derivată din carcinom de col uterin) conțin ADN HPV_{18}. ADN al HPV_{18} pare a fi integrat în genomul celular în aproape toate tumorile de cervix uterin, iar HPV_{16}, este integrat în circa 2/3 din biopsiile de carcinom de col uterin. Nu pare a fi un situs specific de integrare, dar ADN HPV a fost detectat în mod repetat în vecinătatea protooncogenei *myc*. În leziunile benigne și premaligne, ADN persistă extracromosomal.

Tipurile oncogene de HPV imortalizează cheratinocitele *in vitro*.

În celulele neoplazice se sintetizează E_6 și E_7. Pentru genotipurile de risc oncogen înalt, cele două proteine funcționează ca oncoproteine, capabile să se complexeze cu p53 și cu Rb. Experiențele de transfecție a cheratinocitelor cu genele E_6-E_7, au avut ca rezultat imortalizarea celulelor, cu creștere nelimitată *in vitro*. Comutarea pe poziția "stop" a activității acestor gene a fost urmată de încetarea creșterii celulelor *in vitro* și incapacitatea lor de a produce tumori prin transplantare *in vivo*.

Pacienții imunocompromiși prezintă cel mai mare risc neoplazic, mai ales prin contactul homosexual.

Infecția tractului genital cu HPV determină leziuni *displazice* (pierderea stării de diferențiere a celulelor epiteliale), urmată de neoplazie intraepitelială de cervix gradul I, cu un tablou mediu al dediferențierii. În acest stadiu, numeroase leziuni sunt eliminate de sistemul imunitar în mai puțin de un an, prin mecanisme necunoscute. Unele leziuni nu sunt eliminate de sistemul imunitar și persistă un interval de câteva zeci de ani. Persistența infecției cu HPV de risc carcinogenic înalt este cel mai important factor favorizant al dezvoltării malignităților genitale: carcinom cu celule squamoase sau mai rar, adenocarcinom de cervix (fig. 449). Neoplazia cervicală este pe locul 2 ca frecvență a neoplaziilor și a V-a cauză a morții la femei.

Factorii de risc ai neoplaziei cervicale:

- infecția persistentă cu HPV de risc mare (16, 18, 31, 33, 45);
- număr mare de parteneri sexuali;
- imunosupresia;
- fumatul;
- co-infecția cu virusul imunodeficienței umane.

Papilomavirusurile se *transmit* prin celulele încărcate cu virioni, exfoliate din leziuni. Contactul direct este calea cea mai eficientă de propagare. Virusurile cu tropism genital se transmit prin contact sexual. Din leziunile genitale, virusurile se transmit nou-născutului, în timpul nașterii și pot fi cauza papiloamelor *laringiene* la copii (papilomatoză respiratorie recurentă produsă de HPV_6 și HPV_{11}). Papiloamele laringiene sunt rare, dar creșterea lor obstrucționează laringele și trebuie îndepărtate în mod repetat, pe cale chirurgicală. Tumorile extragenitale au ADN HPV mult mai rar decât cele genitale.

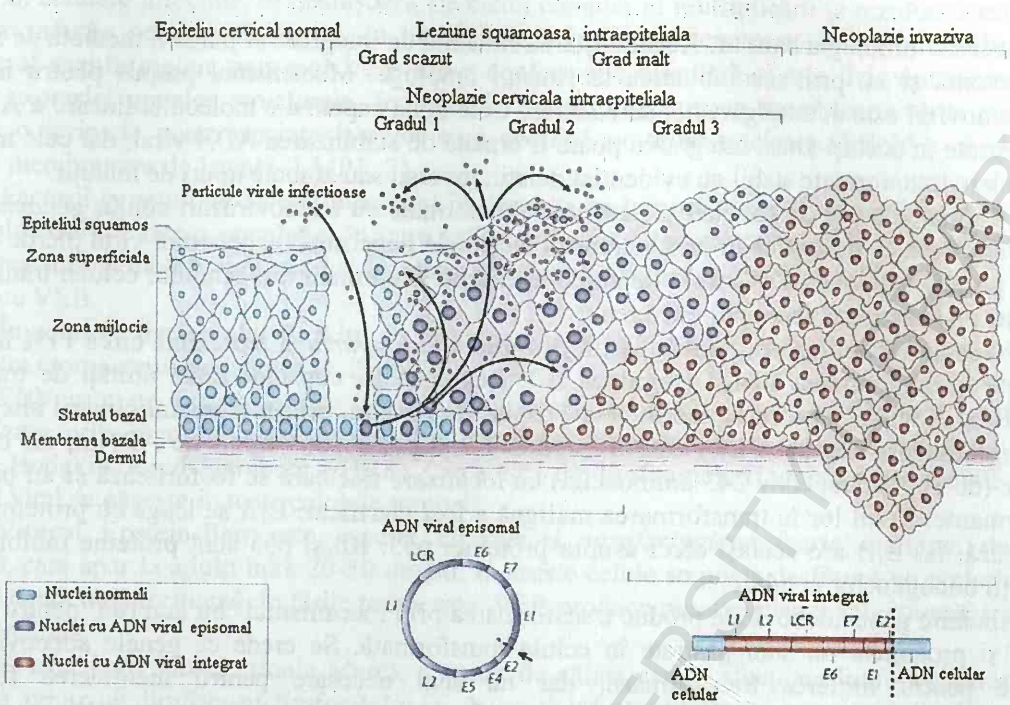


Fig. 449. Evoluția leziunilor epiteliului de cervix uterin infectat cu HPV. În stânga, structura epiteliului normal. Celulele stratului bazal se infectează prin microleziuni epiteliale. În centrul schemei, în celulele suprabazale, ADN viral sub formă episomală, este transcris, se asamblează virus progen, în special în straturile superficiale, iar leziunea rămâne intraepitelială, membrana bazală fiind intactă. In dreapta, ADN viral este integrat în ADN celular, nu se asamblează virus progen, celulele maligne se multiplică invaziv şi sparg membrana bazală (după Bosch şi colab., 1995).

Rata infecției cu HPV este controlată cu vaccinul *tetravalent*, neinfecțios, care conține particule virus-like alcătuite din proteinele L_1 ale HPV 6, 11, 16 şi 18. Vaccinul previne infecțiile persistente cu cele 4 genotipuri de HPV şi apariția leziunilor precanceroase. Nu este eficient față de infecția HPV deja stabilită. Se vaccinează fetele adolescente şi femeile tinere. Vaccinul a fost administrat din 2006 şi nu se anticipează eficiența şi durata imunității antivirale, în special în ariile în care circulă alte subtipuri.

23.8.3. Transformarea cu adenovirusuri

Cele peste 50 de serotipuri de adenovirusuri umane formează cel puțin cinci grupe antigenice (A-E). Câteva serotipuri au potențial oncogen: transformă *in vitro* fibroblastele puilor de rozătoare, iar unele dintre acestea, induc tumori la puii nou născuți de şobolan sau hamster (Trentin, 1962).

Serotipurile 12, 18, 31 sunt foarte oncogene pentru puii nou născuți de rozătoare. Adenovirusurile infectează celulele epiteliale diferențiate terminal ale tractului respirator superior, în care precursorii moleculari ai replicării genomului viral sunt în cantități mici. Ele codifică proteine ce stimulează celula să intre în faza S a ciclului celular, creind astfel un mediu favorabil replicării ADN viral (induc sinteza ADN celular, a enzimelor ce catalizează sinteza dezoxiribonucleotidelor, ribonucleotid-reductaza, Tk, ADN-polimeraza, dihidrofolat reductaza) şi împiedică celula să sufere apoptoza prematură. Dacă celula este permisivă, infecția este productivă, iar dacă este nepermisivă, inducerea fazei S a ciclului celular este suficientă pentru transformare.

Adenovirusurile umane nu au relații demonstrabile cu neoplazia la om. *In vitro*, celulele de rozătoare sunt semipermisive pentru multiplicarea adenovirusurilor umane. Pentru exprimarea exclusivă a capacității transformante, preparatul viral este mai întâi iradiat, deoarece funcțiile sale litice sunt mai radiosensibile. Frecvența apariției celulelor transformate malign de adenovirusuri creşte semnificativ sub acțiunea concomitentă a agenților care activează mecanismele de excizie-reparare, ceea ce sugerează că integrarea ADN viral este stimulată de procesele reparatorii în curs de desfăşurare.

Genomul adenovirusurilor este dublu catenar, linear şi conține circa 35 kbp. Interacțiunea transformantă implică *integrarea genomului* viral la diferite localizări, în ADN cromosomal al gazdei,

fără să necesite omologia bazelor. Recunoaşterea situsului de integrare ar putea fi mediată de interacţia ADN-proteină şi nu prin recombinarea la situsuri omologe. Mecanismul propus pentru integrarea ADN adenoviral este al *configuraţiei de rachetă*. Cele două capete ale moleculei lineare a ADN viral sunt integrate în acelaşi situs. Integrarea poate fi urmată de stabilizarea ADN viral, dar cele mai multe linii celulare transformate stabil au evidenţiat deleţii, inversii sau ambele tipuri de mutaţii.

Celulele de pui de şobolan şi hamster, transformate cu adenovirusuri conţin *genomuri virale incomplete*, ceea ce denotă că în interacţiunea cu celulele nepermisive, genomul viral pierde o parte a genelor proprii. Alteori, ADN viral este complet excizat şi eliminat din genomul celulei transformate, dar acestea îşi păstrează fenotipul oncogen.

Genele virale transformante aparţin *programului timpuriu* şi reprezintă circa 11% în genom, localizate la extremitatea stângă (regiunea E_1). Regiunea E_1 cuprinde două unităţi de transcriere, E_1A şi E_1B. Ambele sunt transcrise în câteva tipuri de ARNm, prin mecanisml clivării alternative a ARN premesager. Regiunea E_1A este transcrisă în cel puţin două tipuri de ARNm, iar cele două proteine (de 289 şi respectiv 243 aminoacizi) cu localizare nucleară se fosforilează şi au proprietăţi transformante. Rolul lor în transformarea malignă a fost clarificat: E_1A se leagă cu proteina Rb şi o inactivează, iar E_1B are acelaşi efect asupra proteinei p53. Rb şi p53 sunt proteine inhibitoare ale activităţii oncogenelor celulare.

Anumite gene adenovirale produc transformarea prin mecanismul 'hit and run' pentru că ADN, ARNm şi proteinele nu sunt păstrate în celula transformată. Se crede că genele adenovirale sunt necesare pentru iniţierea transformării, dar nu sunt necesare pentru menţinerea fenotipului transformant. Genele virale ar favoriza mutaţia sau instabilitatea genetică prin interacţia cu proteinele celulare. Mecanismul 'hit and run', argumentat *in vitro*, nu este relevant pentru transformarea *in vivo*.

23.8.4. Transformarea cu herpesvirusuri

Toate herpesvirusurile transformă celulele *in vitro*, dar numai γ-herpesvirusurile produc tumori la animalele de laborator.

HSV-2 este agentul etiologic al unei infecţii genitale cronice, ce se transmite pe cale sexuală. Femeile cu neoplazie uterină au o incidenţă mai înaltă a infecţiei şi un titru superior al anticorpilor specifici.

În celulele transformate *in vitro* cu HSV-l sau HSV-2 nu s-au identificat gene transformante, de origne virală. Genele virale se pare că nu sunt necesare pentru menţinerea stării transformate. De aceea, s-a presupus acelaşi mecanism de transformare, ca şi pentru adenovirusuri, denumit "hit and run", ce nu necesită permanenţa genelor virale. Transformarea poate fi consecinţa indirectă a acţiunii mutagene a unei gene virale sau este rezultatul activării unei oncogene celulare. Totuşi, este posibilă prezenţa unui fragment de l–3 kb de ADN viral, ce codifică o funcţie transformantă.

Virusul Epstein-Barr (VEB) a fost descoperit în 1964, de către Epstein, în celulele limfomului Burkitt, o tumoră formată din limfocite B. Acest virus infectează cea mai mare parte a populaţiei globului, dar rămâne latent, în special în limfocitele B. In circumstanţe adecvate, VEB poate iniţia proliferarea unor celule: mononucleoza infecţioasă, limfomul Burkitt şi carcinomul nazofaringian. Ultimele două au caracter malign şi apar în anumite zone geografice şi la anumite grupări etnice, ceea ce implică rolul factorilor de mediu şi al celor genetici.

Genomul VEB este o moleculă de ADN dublu catenar, linear, dar se circularizează în celulă, prin legarea secvenţelor terminale repetate. Genomul cuprinde patru regiuni distincte: regiunile *L* (*L*ong) şi *S* (*S*hort) separate prin secvenţele interne repetate invers (IR), iar la capete, secvenţele terminale repetate invers (TR).

VEB are proprietăţi oncogene *in vivo* şi *in vitro*: transformă eficient limfocitele B umane şi ale celorlalte primate *in vitro* şi rezultă *linii celulare stabilizate*, cu creştere indefinită şi tumorigene pentru maimuţe.

Studiile sero-epidemiologice sprijină, dar nu demonstrează cert, ideia că VEB este agentul etiologic al limfomului Burkitt (o tumoră a maxilarului), care apare la copii între 4 şi 15 ani, în ţările Africii tropicale, pe fondul stimulării antigenice cu agentul paludismului. In Uganda, copiii cu titru înalt al Ac anti-proteine capsidale ale VEB au un risc de 30 de ori mai mare de a dezvolta limfomul Burkitt.

În celulele infectate, se desfăşoară fie ciclul complet al multiplicării şi rezultatul este liza, fie are loc o infecţie persistentă latentă. In limfocitele B infectate persistent, în limfomul Burkitt şi în carcinomul nazofaringian, genomul VEB are o conformaţie circulară şi este fizic autonom. Datorită blocării expresiei genelor structurale, în celulele transformate nu se asamblează virus progen, dar exprimă o serie de gene asociate latenţei care codifică proteine nucleare (EBNA1, 2, 3A-3C) şi proteine membranare de latenţă (LMP1, 2).

Factorii genetici au un rol important în dezvoltarea tumorii, ceea ce explică frecvenţa mică a limfomului Burkitt într-o populaţie, în care toţi copiii sunt infectaţi cu agentul malariei şi cu VEB. Activitatea mitogenică a limfocitelor B, datorată stimulării cu antigenele de *Plasmodium* ar uşura infecţia cu VEB.

În celulele limfomului Burkitt, se produce translocaţia unui fragment al cromosomului 8, la unul dintre cromosomii perechilor 14, 2 sau 22.

EBV este un factor de risc pentru producerea *limfomului Hodgkin*. Tumora malignă este caracterizată prin predominanţa infiltratului nemalign, care depăşeşte numărul celulelor maligne (celulele Hodgkin, Reed-Sternberg – HRS). Circa 40% din limfoamele Hodgkin sunt asociate cu EBV: genomul viral se găseşte în toate celulele tumorii.

Virusul Epstein-Barr este asociat cu *tumori nazofaringiene* foarte maligne, de origine epitelială, care apar la adulţi între 20-50 de ani. In aceste celule se poate desfăşura un ciclu litic sau o infecţie latentă transformantă. In ţările temperate, VEB produce mononucleoza infecţioasă, tranzitorie, autovindecabilă.

Virusul bolii Marek. Boala Marek a puilor de găină, este o afecţiune limfoproliferativă şi se manifestă printr-un limfom al limfocitelor T. Virusul infectează latent aceste celule. In *vitro* s-au obţinut linii limfoide T stabilizate şi transformate. Atât *in vivo* cât şi *in vitro*, în celulele transformate, prin tehnicile de hibridare, se detectează 20–130 secvenţe echivalente genomului viral.

Adenocarcinomul renal al broaştei leopard (*Rana pipiens*), descris de Lucke (1934) este produs de un *Herpesvirus*. Virusul izolat din carcinoamele renale, induce tumori la broaştele sănătoase. Adenocarcinomul renal Lucke prezintă două stări naturale, dependente de temperatură. In sezonul cald, celulele tumorale nu conţin virioni. Virusul progen este produs în celulele tumorii, în sezonul rece. Morfogeneza virală este declanşată experimental, prin scăderea temperaturii la +4°C. In sezonul cald, virusul este prezent în celule ca *provirus* şi produce malignizarea. Multiplicarea virusului este termosensibilă. La temperatură scăzută, infecţia are caracterul unui proces litic şi se eliberează virus progen.

Se pare că toate herpesvirusurile conţin informaţie genetică potenţial oncogenă, dar în sistemele permisive, exprimarea sa este mascată de efectul litic. Ca şi în cazul adenovirusurilor, genele funcţiei litice sunt mai radiosensibile decât genele oncogene şi pentru relevarea funcţiei transformante, se recurge la iradierea cu UV a preparatului viral.

23.8.5. Transformarea cu virusul hepatitei B

Virusul hepatitei B (VHB) umane este agentul etiologic posibil al *carcinomului hepatocelular* (CHC), una dintre cele mai maligne neoplazii. Dovezile sunt, în cea mai mare parte, indirecte: riscul de a dezvolta CHC primar este de 223 de ori mai mare la purtătorii de virus decât la nepurtători.

Genomul VHB nu pare să conţină oncogene. Perioada de latenţă, între infecţie şi apariţia tumorii este prea lungă pentru ca hepatocarcinomul primar să fie indus de o oncogenă virală. Rămâne posibilitatea ca o proteină activatoare a protooncogenelor, codificată de *gena x* a VHB să aibă rol în iniţierea procesului de cancerizare.

Virusurile oncogene transformă malign celulele prin integrarea genomului lor în cromosomii celulei. Inserţia secvenţelor virale în vecinătatea oncogenelor celulare perturbă uneori expresia lor şi poate declanşa creşterea necontrolată. Astfel acţionează, după o perioadă de latenţă, retravirusurile netransductoare ce produc leucemii şi carcinoame la păsări şi mamifere.

Pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare, VHB nu necesită integrarea genomului său în ADN celular.

Genomul VHB se găseşte integrat în unul dintre cromosomii hepatocarcinomului la purtătorii cronici ai hepatitei B, dar uneori şi în tumorile pacienţilor fără Ag HBs seric. De asemenea, ADN al

VHB se găseşte integrat în hepatocitele unor purtători cronici de VHB. De aceea se crede că ADN al VHB se integrează înainte de transformarea malignă.

Analiza moleculară relevă că ADN viral se inseră în cromosomii umani la situsuri diferite. Inserţia determină apariţia rearanjărilor genetice (deleţii, translocaţii, amplificări). Aceste anomalii sunt frecvente în tumorile umane. Integrarea nu pare să aibă loc în domeniile genomice ale protooncogenelor şi nici nu alterează expresia lor funcţională.

ADN al VHB s-a detectat, în stare integrată, în gena ce codifică receptorul pentru acidul retinoic (derivat al vitaminei A), cu rol în diferenţierea şi proliferarea celulară (Dejean, 1991).

Gena virală x codifică sinteza unei proteine (x) care, deşi nu interacţionează direct cu ADN celular, are rolul de factor activator al transcrierii genelor virale şi celulare, inclusiv al genelor N-myc şi NF-kB.

În circa 30% dintre hepatoame, gena p53 este mutantă, mai ales la cei intoxicaţi cronic cu aflatoxine mutagene. Proteina x, probabil interferă cu mecanismele reparatorii ale ADN, care poate să crească rata mutaţiei p53.

La marmotă (*Marmota monax*), ADN al virusului hepatitei este integrat în ADN al celulelor tumorale. In 30% din cazuri, genomul viral se integrează în vecinătatea oncogenelor celulare *myc*, cu rol în creşterea şi diferenţierea celulară. O parte a genomului viral se inseră lângă *oncogena myc*, fără să altereze informaţia ei. Dar, proteina *Myc* este sintetizată în exces şi stimulează creşterea celulară necontrolată. Mecanismul acţiunii ei este identic cu acela al retravirusurilor oncogene netransductoare.

Un alt factor mutagen cu rol în evoluţia hepatitei cronice îl constituie oxidanţii ($^1O_2$, peroxidul, radicalii superoxid (O_2^-) şi hidroxil ($OH^\cdot$), generaţi de celulele fagocitare în focarul inflamaţiei cronice a ficatului. Oxidanţii determină ruperi monocatenare ale ADN sau activează exprimarea unor protooncogene. Pe aceiaşi cale produc leziunile hepatocelulare cronice, factorii nevirali: consumul cronic de alcool. Hepatita cronică alcoolică evoluează spre ciroză, ca şi cea cronică virală.

Bibliografie

Roman A. 1989. Human *Papillomaviruses*: are we ready to type ? Clin. Microbiol. Rev. 2, 166–190.

Longworth M. S., Laimins L. A. 2004. Pathogenesis of Human *Papilloma* Viruses in Differentiating Epithelia. MMBR 68, 2, pp. 362–372.

Bosch X., Manos M. M., Munoz N., Sherman M., Jansen A. M., Peto J., Schiffman M., Moreno V., Kurman R., Shan K. V. 1995. Prevalence of Human *Papilloma* virus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. J. for Nat. Cancer Institute 87 (11), pp. 796–802.

Christopher P. C., Barber S., James R. K. 1991. Pathobiology of Papillomavirus-Related Cervical Diseases. Prospects for Immunodiagnosis. Clin. Microbiol. Rev. vol. 4, no. 3, pp. 270–285.

Orth G. 2008. *Papillomaviruses*: General Features of Human Viruses, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Major E. O., Amemiya K., Tornatore C. S., Houff S. A., Berger J. R. 1992. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain – Clin. Microbiol. Rev. 5: 49–73.

Cole C. N. 1996. Polyomavirinae: The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Press, Philadelphia.

Howley P. M. 1990. Papillomavirinae and Their Replication, în vol. Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, New York.

Zur Hausen, H. 1989. *Papilloma* Viruses as Carcinoma Viruses – Advances in Viral Oncology, vol. 8, edited by G. Klein, Raven Press, Ltd, New York.

Zur Hausen H., De Villiers E.M. 1994. Human *Papillomaviruses* – Annu. Rev. Microbiol. 48: 427–447.

Shah K. V., Howley P. M. 1996. *Papillomaviruses*, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Press, Philadelphia.

Shah K. V., Howley P. M. 1990. *Papillomaviruses*, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York

Mişcalencu D., Mailat F., Mihăescu Gr. 1981. Viral particles in the hepatocytes of *Rana aesculenta* (L). Rev. Roum. Med. (Virol.), 32, 2, 123–128.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

24. AGENŢI INFECŢIOŞI SUBVIRALI

Ideia că virusurile ar reprezenta cel mai simplu tip de agenți infectioşi a fost infirmată de evidențierea în ultimele decenii, a unor agenți subvirali, patogeni pentru plante, om şi animale, care produc boli grave, mortalitate şi mari pagube economice.

24.1. Virusul hepatitei D

Virusul hepatitei D (*HDV*) este clasificat ca un virus satelit, deoarece în ciclul multiplicării sale, HBV este un helper esențial. Din această cauză, infecția cu virusul hepatitei D este asociată, în mod obligatoriu, cu virusul hepatitei B şi cu antigenul HBs.

VHD a fost descoperit în '77, de către o echipă care studia biopsiile hepatice de la pacienții pozitivi pentru HBs. Anticorpii marcați cu fluoresceină, purificați de la un pacient pozitiv pentru Ag HBs şi HBc, reacționează nu numai cu Ag HBc din hepatocitele aceluiaşi pacient, ci şi cu țesutul hepatic obținut prin biopsie de la pacienții cu hepatită B, *negativi pentru Ag HBc*.

Noul Ag din hepatocitele negative pentru HBc s-a numit *Ag D*.

Ag D se aseamănă cu *Ag HBc*, în primul rând din punct de vedere serologic: dau reacție încrucişată, adică ambele reacționează cu Ac specifici față de unul dintre ele.

Distribuția tisulară a celor 2 Ag este aceiaşi: *Ag D este asociat în mod obligatoriu cu VHB şi cu Ag HBs, dar rareori coexistă cu Ag HBc*.

5% dintre pacienții cu hepatită B sunt pozitivi pentru Ag D. Ag D nu se găseşte niciodată la pacienții cu hepatita non-B.

VHD nu a fost clasificat. Se aseamănă mai mult cu virusurile satelite ale plantelor, deoarece necesită funcția helper a unui virus neînrudit. Ca şi la virusurile satelite, genomul HDV conține o secvență codificatoare pentru o singură *proteină structurală*.

Din punct de vedere structural, preparatele de HDV colorate negativ, sunt heterogene ca dimensiuni, cu diametrul mediu de 36 nm (26–39 nm).

HDV are ca genom o moleculă de *ARN mc circulară* închisă covalent, asociată *cu două variante biochimice* ale proteinei structurale ce constituie AgHD. Impreună formează o nucleocapsidă incompletă (fig. 450).

Nucleocapsida este învelită de Ag HBs, codificat de VHB. Învelişul HDV are caracteristicile fizice şi antigenice ale virusului helper.

Genomul ARN al HDV este alcătuit din 1679–1683 nt. Este cel mai mic genom dintre cele cunoscute pentru virusurile infecțioase pentru animale.

La EF în gel de PAA s-au identificat două variante de ARN – cu conformație *lineară* şi *circulară*, variante ale aceleiaşi molecule. Forma *circulară închisă covalent* reprezintă molecula nativă. 70% dintre baze sunt complementare şi formează o structură alungită, în esență dublu catenară.

Multiplicarea. VHD nu a fost cultivat nici în liniile celulare hepatice care conțin ADN al VHB integrat. Aceste linii nu pot fi infectate nici cu VHB. Faptul reflectă, probabil, pierderea receptorilor membranari prin intermediul cărora cele două virusuri se fixează pe membrana hepatocitului.

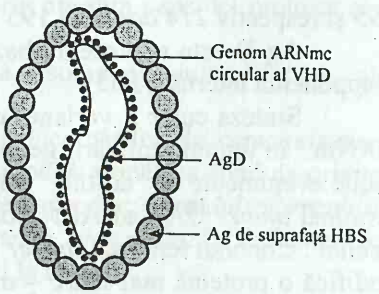


Fig. 450. Reprezentarea schematică a structurii virusului hepatitei D (VHD). Genomul circular mono-catenar este asociat cu antigenul D (proteina D) codificat de virus. Învelişul viral este asamblat din proteina HBs, codificată de virusul hepatitei B.

Spectrul de gazdă al VHD este limitat la speciile permisive pentru multiplicarea unui hepadnavirus, capabil să furnizeze funcţia helper pentru asamblarea VHD: cimpanzeul, sensibil la infecţia cu VHB, *Marmota monax,* raţa de Pekin.

La cimpanzeu, co-infecţia experimentală cu HDV şi HBV poate să producă o hepatită moderată până la severă, cu exprimarea simultană a Ag D şi HBc în hepatocite. Simultan se sintetizează Ac anti-HD şi anti-HBc.

Mecanismele de fixare, pătrundere în celulă şi dezvelire nu se cunosc.

Replicarea genomului. Genomul virusului hepatitei D, este o moleculă de ARN monocatenar, circulară, covalent închisă, formată din 1679–1683 de baze (1,7 kb), de *polaritate negativă.* Molecula se pliază şi bazele complementare se împerechează în proporţie de 70%, formând o structură de formă alungită neramificată. Replicarea genomului este dependentă de ARN-pol, are loc în nucleu şi este catalizată de ARN-pol II a celulei. Molecula genomică funcţionează ca matriţă pentru transcrierea unei catene multimerice antigenomice, după modelul cercului rotativ. Pentru iniţierea transcrierii este necesară clivarea moleculei circulare. O secvenţă genomică de 85 nucleotide a ARN genomic şi antigenomic, funcţionează ca o enzimă de autoclivaj, ca o ribozimă cu situs unic de acţiune (ARN are funcţie *ribozimică*). Clivarea şi ligarea ARN se produc în absenţa proteinelor enzimatice*. Molecula de ARN are activitate *enzimatică ribozimică.*

* În celulă, clivarea moleculelor de ARN, excizia intronilor şi înnădirea exonilor sunt catalizate de proteine enzimatice.

În celulele hepatice se găsesc molecule de ARN de diferite dimensiuni, cu polaritate genomică sau antigenomică, dintre care unele sunt multimeri ai genomului de 1,7 kb. Raportul moleculelor genomice/antigenomice variază între 5–30/1. Majoritatea moleculelor genomice sunt mc, iar cele antigenomice sunt complexate cu catene genomice, prin complementaritatea bazelor. Variatele forme de ARN în nucleul hepatocitelor sunt în acord cu replicarea după *mecanismul cercului rotativ*, ca şi ARN viroidal (vezi replicarea ARN viroidal).

Moleculele *circulare* de polaritate genomică au rol de matriţe pentru sinteza moleculelor *multimere lineare* complementare, iar acestea sunt copiate în molecule multimere lineare de polaritate genomică.

Moleculele multimere, cu polaritate genomică, sunt clivate la situs specific. Clivarea este autocatalitică şi rezultă molecule monomere. Legarea extremităţilor generează molecule închise covalent.

Copierea matriţei genomice, dar şi a catenei lineare multimere antigenomice este catalizată, probabil, de *ARN-polimeraza II* a celulei, care "greşeşte" matriţa ei naturală (molecula de ADN).

Genomul se poate replica şi în celule nehepatice, în absenţa VHB. Ag D nu are rol în replicare, ci numai în stabilizarea ARN genomic pentru împachetare.

24.1.1. Proteine codificate de virus

ARN antigenomic este tradus în Ag D şi are probabil rol de matriţă pentru sinteza ARN genomic.

În serul şi în mojaratul hepatic de la pacienţii cu HDV se găsesc 2 Ag foarte asemănătoare: *195* şi respectiv *214 aac*. Cei 195 aac sunt aceiaşi pentru ambele forme.

Ag D este o proteină bazică fosforilată şi se acumulează în nucleii celulelor infectate. Este componenta internă a HDV.

Sinteza celor 2 variante este rezultatul unui proces de modificare post-transcriere (editing) a ARNm: în timpul replicării genomului, o fracţie a copiilor de ARN antigenomic, suferă unul sau mai multe evenimente de "editing" post-transcriere. Unul dintre ele este esenţial: *A* din mijlocul codonului terminal *amber* UAG al ARN codificator al *Ag D de 195 aminoacizi*, este dezaminată de o enzimă a celulei*. Codonul terminal *amber* este înlocuit cu codonul (UIG) pentru sinteza Trp. ARNm modificat, codifică o proteină mai mare – *antigenul D de 214 aminoacizi*, o proteină bazică, fosforilată care se acumulează în nucleul celulei infectate.

* Dezaminarea *A* are importanţă biologică majoră. Conversia *A* la *I* (*Inozină*) modifică mesajul ARN, deoarece *I* este recunoscută ca *G* (nu ca A). Molecula de ARN astfel modificată este tradusă într-o proteină a cărei secvenţă de aminoacizi diferă faţă de a proteinei native.

Antigenul mic se sintetizează timpuriu, este reglator şi are efect stimulator asupra replicării genomului.

Antigenul mare este sintetizat mai târziu în infecție, este inhibitor al replicării genomului, dar este esențial pentru asamblarea particulei de HDV. Antigenul mare favorizează interacția HDV cu proteinele de înveliș ale HBV și este un represor al multiplicării HDV. Dacă sinteza proteică nu se comută de la varianta mică la varianta mare, infecția acută poate să progreseze la o hepatită fulminantă.

Epidemiologie. Se presupune existența a două modalități de infecție: infecția concomitentă cu HBV și HDV, hepatita fiind mai severă; suprainfecția pacienților HBV cu virusul δ. În absența Ag HBs, virusul δ este multiplicat, dar nu se disemineză de la o celulă la alta.

Patologie. Infecția cu virusul δ produce hepatita acută și cronică, numai în prezența VHB. ECP al VHD pare a fi preponderent față de efectele imunoreactivității spre deosebire de alte hepatite virale, la care leziunile celulare sunt consecința, în primul rând a reactivității imunitare.

Ficatul este singurul organ implicat, cu necroză celulară și inflamație, ca și în alte hepatite virale distructive, dar hepatita D este mai severă. Celulele inflamatorii – limfocite și macrofage, sunt foarte evidente în parenchim.

Perioada de incubație este de 3–7 săptămâni. Urmează faza preicterică, cu simptome nespecifice (3–7 zile). Cresc valorile ALT (alanin-aminotransferaza) și AST (aspartat-aminotransferaza).

Faza icterică, dacă apare, se caracterizează prin urină de culoare închisă (brună) și colorarea tegumentului. În unele cazuri, hepatita severă, considerată ca fiind produsă de HBV este de fapt rezultatul infecției concomitente cu VHD.

Pentru *diagnosticul* HDV se folosesc teste pentru detectarea Ac anti-HD (IgG și IgM) și pentru detectarea Ag HD și a ARN VHD. În biopsiile de ficat, prin metoda IF sau a imunoperoxidazei se evidențiază Ag D.

Bibliografie

Taylor J. M. 1996. Hepatitis Delta Virus and Its Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition. edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Taylor J. M. 1992.The Structure and Replication of Hepatitis Delta Virus. Annu. Rev. Microbiol. 46: 253–276.

Purcell R. H., Gerin J.L. 1990. Hepatitis Delta Virus, în vol. Virology, sec. ed., ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Polish L. B., Gallagher M., Fields H. A., Hadler S. C. 1993. Delta Hepatitis: Molecular Biology and Clinical and Epidemiological Features – Clinical Microbiology Reviews. vol. 6, no. 3.

Sureau C., Guerra B., Lee H. 1994. The Middle Hepatitis B Virus Envelope Protein is not Necessary for Infectivity of Hepatitis Delta Virus – Journal of Virology. vol. 68, no. 6, pp. 4063–4066.

Howard C. R., Zuckerman A. J. 1990. Viral Hepatitis, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

24.2. Viroizii

Viroizii reprezintă o categorie specifică de agenți infecțioși subvirali, patogeni exclusiv pentru plante, caracterizați printr-un genom alcătuit din ARN pur, prin absența capsidei proteice și a stadiului de virion.

Denumirea de "viroid" (cu aspect de virus) este neadecvată, deoarece genomul lor nu este niciodată protejat de un înveliș proteic.

Viroizii s-au descoperit accidental (Diener, 1971), cu ocazia încercărilor de caracterizare a agentului patogen al bolii tuberculilor fusiformi la cartof, considerată până atunci ca fiind de origine virală. Viroizii cunoscuți în prezent au luat numele maladiei pe care o produc: *viroidul tuberculilor fusiformi la cartof, al nanismului și marmorării clorotice a crizantemelor, al nanismului la hamei* etc. Cel mai studiat este viroidul, care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof.

Morfologie și structură moleculară. Viroizii sunt molecule de ARN pur. La microscopul electronic, ei apar sub forma unor structuri lineare, ca niște bastonașe, ușor curbate, lungi de circa 50 nm; cu o grosime de 2,0–2,5 nm, izolate sau grupate în agregate compacte. Greutatea lor moleculară este cuprinsă între 75–125 kDa.

Structura moleculară a viroidului care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof, este cu totul neobișnuită, fiind reprezentată de molecule de ARN mononatenar, circulare, închise covalent, alcătuite din *359 ribonucleotide*, a căror structură primară (secvență) a fost determinată cu exactitate.

Structura secundară, de dublă helice defectivă, este de asemenea foarte caracteristică. Datorită gradului ridicat de complementaritate intramoleculară, un număr mare de baze (244, respectiv 68%) sunt legate în perechi. Ele formează regiuni dublu catenare (rezultate din împerecherea intracatenară a unei secvențe de 4–5 baze), care alternează cu regiuni mai scurte monocatenare (2–3 baze), sub forma unor bucle interne și terminale, corespunzătoare regiunilor lipsite de baze complementare, care rămân separate. Acest tip de structură, numită "în ac de păr", impune anumite constrângeri topologice, datorită cărora molecula de ARN suferă o pliere tridimensională. După denaturare cu formaldehidă, la 63°, legăturile de H dintre bazele complementare se rup și la microscopul electronic se observă molecule circulare monocatenare cu lungimea de 140 nm și molecule lineare monocatenare cu lungimea medie de 110 nm.

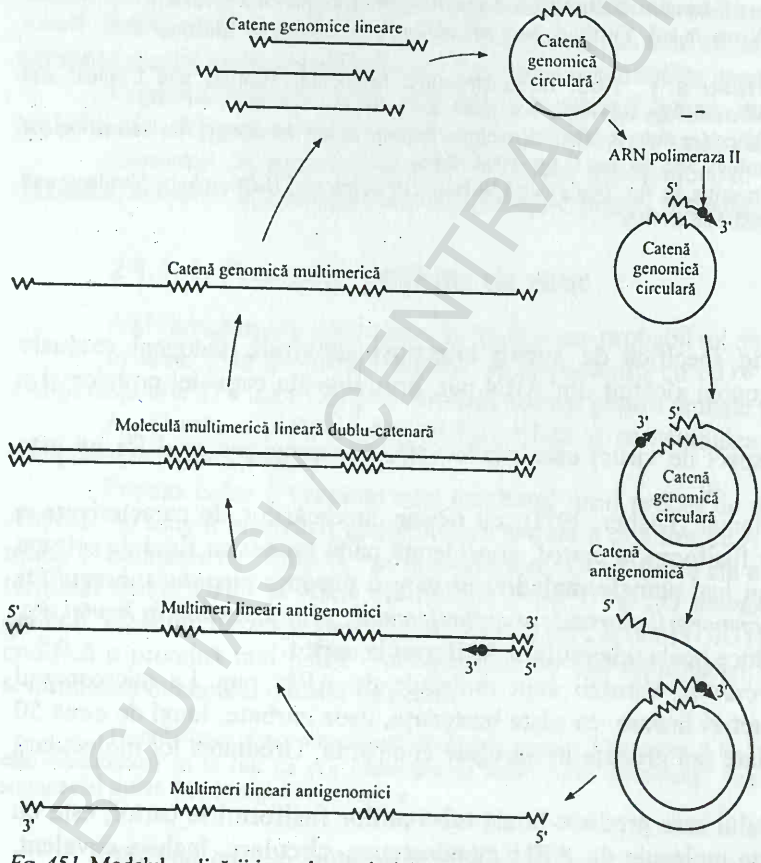
Datorită dimensiunilor mici, viroizii au rezistență deosebită la agenții fizici (radiații) și chimici.

Mecanismul replicării ARN viroidal nu este cunoscut. Cantitatea de informație genetică a ARN viroidal este foarte mică (teoretic suficientă numai pentru a codifica o proteină alcătuită din 119 aminoacizi). Experiențele cu extracte acelulare de plante și bacterii au evidențiat că ARN viroidal nu are capacitatea de codificare, datorită absenței situsurilor de legare ribosomală (absența *codonului initiator AUG*) și datorită structurii secundare stabile și circularității moleculei. ARN viroidal nu funcționează ca ARNm. Absența capacității de codificare a ARN viroidal este confirmată de faptul că din celulele vegetale infectate nu s-a purificat nici o proteină străină de proteinele plantei, care să sugereze originea viroidală.

Replicarea viroizilor este, în consecință, total dependentă de celulă, reprezentând o formă aparte de parazitism absolut, distinctă de tipul celei descrise pentru virusuri.

Au fost propuse mai multe modele ipotetice, bazate pe cunoștințele actuale de biologie moleculară, implicând activitatea unor enzime diferite.

Modelul lui Branch și *Robertson* (1984) este cel mai probabil, deoarece se bazează pe evidențierea concomitentă, în celulele infectate, a două tipuri de molecule de ARN, respectiv, molecule tipice de *ARN viroidal circulare* (notate convențional "+") și molecule de *ARN multimere lineare*, cu o secvență complementară (notate "–").



Fg. 451. Modelul replicării ipotetice a viroizilor după mecanismul cercului rotativ.

Modelul consideră că moleculele multimere de ARNc sunt *intermediari de replicare*, iar forma circulară a viroizilor maturi, sugerează că replicarea s-ar face prin *mecanismul cercului rotativ* (fig. 451), sub controlul *ARN-polimerazei II celulare*, a cărei legare de extremitățile viroizilor a fost evidențiată prin microscopie electronică. Rezultă molecule lineare multimere de sens antigenomic. Acestea sunt transcrise în molecule multimere complementare de *sens genomic*, ulterior prelucrate prin clivaj la situs specific. După legarea extremităților se formează molecule circulare mature. În mod surprinzător, activitățile enzimatice de clivare și legare a extremităților, se desfășoară în absența proteinelor enzimatice și se aseamănă cu mecanismul autoexciziei intronilor din ARN premesager al organitelor. ARN are activitate enzimatică – *ribozimică*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deoarece, în mod normal, ARN-polimeraza II celulară foloseşte ca matriţă o molecula de ADN, autorii consideră că, datorită structurii lor unice, prezenţa viroizilor în celule ar fi interpretată greşit de enzimă, ca o moleculă de ADN. După aceşti autori, viroizii ar fi agenţi similari ADN (ADN-like).

După alţi autori, replicarea moleculei de ARN viroidal este *autocatalitică*. O moleculă de ARN care se replică autocatalitic se numeşte *ARN-replicază*.

Replicarea viroizilor are loc în nucleul celulelor şi, ca urmare, infecţiozitatea maximă este asociată cu nucleul şi, în special, cu cromatina celulelor infectate.

În funcţie de faza infecţiei, numărul viroizilor variază între 200 şi 10.000/celulă.

24.2.1. Patogenitatea viroizilor

Deşi cantitatea de informaţie genetică pe care o aduc în celulă este foarte mică, viroizii produc mai mult de 10 maladii grave ale plantelor de cultură sau ornamentale, cu importanţă economică. Între acestea, cele mai studiate sunt: boala tuberculilor fusiformi la cartof, nanismul şi marmorarea clorotică a crizantemelor, nanismul hameiului, boala cadang-cadang a cocotierului şi o boală caracteristică a portocalilor şi lămâilor, însoţită de distrugerea progresivă a scoarţei şi scăderea masivă a producţiei de fructe.

Infecţia experimentală reproduce tabloul manifestărilor patologice la plante din aceiaşi specie, datorită replicării excesive a acestor entităţi moleculare cu caracter infecţios. ARN viroidal care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof, se propagă la un număr foarte mare de plante din familia *Solanaceae*, dar şi la plante din alte familii, unde se replică fără să producă simptomele îmbolnăvirii.

Viroizii produc infecţii persistente: la cartof, simptomele apar în perioada formării tuberculilor, iar la tomate, la 2–3 săptămâni de la infecţie. În frunzele de tomate şi în peţiol, după infecţia cu ARN viroidal al tuberculilor fusiformi de cartof, se produce o hipertrofie marcată a nucleului şi se intensifică curenţii citoplasmatici. În ţesutul infectat, infecţiozitatea este asociată cu fracţia sa nucleară, ceea ce denotă că ARN viroidal este asociat cu nucleul şi în special cu cromatina celulelor.

Mecanismul producerii bolilor viroidale este greu explicabil, deoarece ARN viroidal nu codifică sinteza unor proteine noi. Ţesuturile plantelor infectate nu conţin proteine noi, în raport cu plantele sănătoase, dar prezintă variaţii cantitative foarte importante ale unor proteine normale. Este probabil că viroizii determină o perturbare a mecanismelor de reglare a exprimării anumitor gene ale celulei. Viroizii nu ar acţiona prin exprimarea propriei lor informaţii genetice, ci prin perturbarea funcţiei genelor celulare, a cărei consecinţă ar fi alterarea mecanismelor normale de reglare a funcţiilor celulei.

Viroizii posedă secvenţe complementare faţă de ARN 7S al celulei: ARN 7S împreună cu un set de 6 proteine formează un complex ce controlează inserţia posttraducere a proteinelor în membrană. Genomul viroidal poate să interfere antisens cu ARN cu ARN 7S şi astfel, indirect, cu formarea membranei.

În unele cazuri, s-a observat o scădere pronunţată a cantităţii de gibereline în ţesuturile plantelor infectate. Deoarece acidul giberelic poate regla evenimentele nucleare ale transcrierii, precum şi metabolismul unor specii de ARN, replicarea viroizilor şi/sau patogenitatea lor ar putea fi influenţate prin intermediul acestei clase de mediatori hormonali.

Tulburările de creştere, frecvent asociate cu infecţiile viroidale, pot fi astfel explicate ca rezultat al unui dezechilibru al sintezei şi activităţii hormonilor de creştere: viroizii prezenţi în nucleul celulelor, ar acţiona ca molecule anormale de reglare, care interferă cu cele care asigură în mod normal reglarea genelor ce codifică hormonii de creştere.

Transmiterea viroizilor pe orizontală, de la o plantă bolnavă, la plantele sănătoase se realizează în mod obişnuit, pe cale mecanică (de exemplu, prin altoire sau prin alte leziuni mecanice), probabil prin intermediul nucleilor celulari sau al unor fragmente de cromatină, care conţin ADN viroidal. Conservarea infecţiozităţii viroizilor în cursul transmiterii, în fazele extracelulare, adică păstrarea infecţioziăţtii lor în absenţa învelişului proteic (capsidal) este datorată localizării lor intranucleare, la adăpost de atacul enzimatic.

Transmiterea viroizilor pe verticală, se face prin polenul infectat al plantelor de tomate sau cartof.

Originea viroizilor este necunoscută. Au fost propuse mai multe ipoteze.

1. *Ipoteza originii virale* a fost formulată în două variante:

a) Viroizii ar fi entităţi virale foarte primitive, care nu au ajuns la gradul de complexitate structurală şi genetică, necesare pentru a induce în celulă, reacţiile metabolice noi, de biosinteză, pentru a codifica sinteza proteinelor specifice, capabile să asigure propria lor replicare;

b) Viroizii ar reprezenta entităţi virale degenerate, a căror biosinteză şi replicare a fost iniţial determinată de infecţia cu ARN viral, care a suferit o reducere importantă a genomului (inclusiv a genelor care codifică proteinele capsidei) şi a căpătat o autonomie totală.

2. *Ipoteza originii celulare* consideră viroizii ca provenind din acizii nucleici ai celulei:

a) Viroizii ar putea proveni din *transcrierea unor gene cromosomale* patologice, sub influenţa unor factori încă nedeterminaţi, sau ar fi derivaţi dintr-o specie de ARN cu gr. mol. mică, de genul celor prezente în nucleu şi nucleol, implicate în mod normal în reglarea unor funcţii nucleare şi în transcrierea ARN;

b) *Viroizii ca derivaţi ai elementelor genetice transpozabile (EGT)*. Ipoteza se bazează pe observaţia că viroizii conţin secvenţe care se aseamănă cu cele prezente la extremităţile EGT. Viroizii ar fi evoluat din EGT sau din provirusuri retravirale, din care, în cursul transcrierii la ARN, ar fi dispărut unele secvenţe de baze;

c) Ipoteza originii viroizilor prin *circularizarea intronilor*, se bazează pe faptul ca genele celulelor eucariote, ca şi cele ale virusurilor animale, au o structură discontinuă, în sensul că sunt formate din secvenţe cu rol de codificare (exoni), care prin transcriere sunt regăsite în structura ARN matur şi secvenţe intercalate (introni), care sunt clivate în etapa de prelucrare a ARN premesager.

În cursul procesului de biosinteză a proteinelor, întreaga genă (exonii şi intronii) este transcrisă la o moleculă mare de ARN premesager. Ulterior, acesta suferă un proces de maturare, prin care intronii sunt îndepărtaţi de o enzimă specială, iar exonii sunt "lipiţi" sau înnădiţi cap la cap, pentru a forma o moleculă de ARN matur, care trece în citoplasmă şi este tradusă într-o secvenţă polipeptidică.

Secţionarea intronilor este controlată de o moleculă mică de ARN (ARN U_1), prezentă în nucleii celulelor vegetale, parţial omolog cu intronii, care se leagă de extremităţile acestora, asigurând excizia corectă. Final, intronii se circularizează sub controlul unei ARN-ligaze. Circularizarea împiedică degradarea enzimatică, conferă posibilitatea de replicare necontrolată şi de infecţiozitate, prin mobilitate intercelulară şi între organisme.

24.3. Virusoizii

Virusoizii sunt o clasă particulară de ARN satelite în celulele plantelor infectate cu virusuri, descoperite în 1983. Sunt molecule mici de ARN monocatenar încorporate în *stare fizic autonomă* (ARN_2), în capsida unor virusuri fitopatogene cu genom segmentat sau *integrate* în genomul viral (ARN_1).

Virusoizii sunt totdeauna dependenţi de virusuri helper şi sunt încapsidate de o proteină de înveliş a virusului helper.

Moleculele de ARN satelite pot fi :

– mai mari de 500 nucleotide;

– mai mici de 500 nucleotide, unele lineare, iar altele circulare (asemănătoare viroizilor).

Moleculele mari de ARN pot să codifice proteine. Replicarea moleculei de ARN genomic este catalizată de ARN-polimeraza virusului helper sau de ARN-polimeraza dependentă de ARN a celulei vegetale. Activitatea ARN-polimerazei dependentă de ARN, detectabilă în multe tipuri de celule vegetale neinfectate, se intensifică după infecţia virală şi nu are specificitate de virus, în timp ce ARN-polimerazele virale sunt specifice. Virusoizii nu se multiplică în absenţa virusului helper, fie datorită absenţei replicazei, fie datorită absenţei proteinelor capsidale.

ARN satelit, asemănător celui viroidal, are domenii *ribozimice*. Ribozimele au rol în replicare. S-a presupus că ARN satelit viroid-like are origine filogenetică comună cu viroizii.

Virusul hepatitei D are proprietăţi asemănătoare cu ARN viroidal: este circular, dependent de un virus helper şi are activitate ribozimică.

Virusoizii VTMV (*Velvet tobacco mottle virus*), care produce o formă specială de marmorare la plantele de tutun, ca şi cel care produce marmorarea unor plante tropicale (*Solanum nodiflorum mottled virus*), sunt integraţi în genomul viral, prezenţa lor asociată fiind obligatorie pentru producerea infecţiei.

Virusoizii se deosebesc de viroizi, prin faptul că genomul lor este încapsidat şi este incapabil să infecteze plantele sensibile, în absenţa genomului viral asociat.

Bibliografie

Roossinck M. J., Sleat D., Palukaitis P. 1992. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. Microbiol. Rev. 56(2): 265–279.

Creighton T. C. 1999. Encyclopedia of Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

24.4. Virino

Sub această denumire a fost descris un agent infecţios subviral, alcătuit dintr-o moleculă mică de acid nucleic, asociat cu o proteină codificată de celula gazdă. Acidul nucleic nu codifică sinteza unor proteine, dar are rol de matriţă pentru propria sa replicare, catalizată de enzimele celulei gazdă. El are, probabil, un rol de reglare a activităţii celulelor infectate, declanşând sinteza unor proteine codificate de celula gazdă.

24.5. Prionii

Prionii formează o categorie specială de agenţi infectioşi subvirali, patogeni pentru om şi animale, alcătuiţi exclusiv dintr-o *moleculă proteică*. Sunt lipsiţi de genom şi, în consecinţă, diferă de toate celelalte categorii de agenţi infectioşi prezenţi în natură, prin faptul că nu conţin nici-un tip de acid nucleic (nici ADN, nici ARN).

Conceptul de *prion* (*pr*oteinaceous *i*nfectious) a fost definit de Prusiner (1982), după circa 20 de ani de studii asupra bolii *scrapie*. Denumirea reflectă unul dintre simptomele sale majore, respectiv pruritul (*to scrapie*, lb.engleză = a freca, a răzui, a curăţi răzuind lâna). Studiile asupra bolii *scrapie*, semnalată încă din secolul XVIII în Marea Britanie au incriminat, în ultimele 5 decenii, peste 20 de tipuri de agenţi patogeni, incluzând virusuri, viroizi, protozoare, macromolecule replicative etc.

Prionii sunt alcătuiţi dintr-o *glicoproteină hidrofobă*, cu gr. mol. de 28 kDa, extrem de rezistentă la degradarea cu proteaze, la formol 10% (timp de 28 de luni) şi la căldură (fierbere timp de trei ore), precum şi la toţi agenţii inactivatori ai acizilor nucleici.

Prin analogie cu nomenclatura proteinelor din Virologie (*VP – Viral Protein*), această proteină infecţioasă şi patogenă a fost denumită *proteina rezistentă la proteaze* (*PrP*, Prusiner, 1983; Mc Kinley, 1983).

Maladiile prionice constituie un grup de afecţiuni neurodegenerative, reprezentate la om de maladia Creutzfeldt-Jakob (MCJ), kuru, sindromul Gerstmann-Straussler Scheinker (GSS), insomnia familială fatală (IFF), de encefalopatia spongiformă a bovinelor* (boala vacilor nebune) (ESB) şi felinelor, maladia scrapie (tramblanţa) a ovinelor şi caprinelor, encefalopatia nurcilor, maladia epuizării cronice a rumegătoarelor sălbatice. Aceste maladii se caracterizează prin acumularea unei proteine, denumită PrP^{sc}, ce corespunde unei *forme alterate a proteinei normale* PrP^{c}.

Creierul persoanelor sau animalelor atinse de encefalopatia spongiformă are aspect spongios. Maladiile prionice sunt transmisibile de la organismul bolnav la cel sănătos al aceleiaşi specii sau al unor specii diferite.

* Encefalopatia spongioasă transmisibilă (EST) a fost adusă în prim planul actualităţii în 1996, după ce medicii veterinari englezi au relevat posibilitatea transmiterii ei la om. Epidemia ESB a atins apogeul în anii '92–'93, în Anglia, cu 3500 de noi cazuri declarate lunar. A fost incriminată alimentaţia bovinelor: fabricile de furaje proteice au introdus făini de origine animală (carcase de ovine şi bovine). Modificarea procedeului tehnic a survenit în anii '80, când temperatura de sterilizare a fost coborâtă de la 130 la 110°C, iar etapa de extracţie cu solvenţi organici a fost eliminată. Ar fi interesant de clarificat modul în care PrP^{sc} din carnea infectată este transportată din intestin în SNC. Celulele dendritice vasculare pot fi un rezervor pentru HIV la pacienţii SIDA şi pentru proteina PrP^{sc} în maladia prionică Creutzfeld-Jacob.

Fracția infecțioasă a creierului de ovine se distinge printr-o rezistență foarte mare la tratamentele care alterează acizii nucleici (razele γ și UV) și este insensibilă la formaldehidă și la temperaturile care inactivează toate virusurile cunoscute. Agentul infecțios poate să reziste la 360° căldură uscată. O infecțiozitate reziduală persistă chiar după incinerarea la 600°.

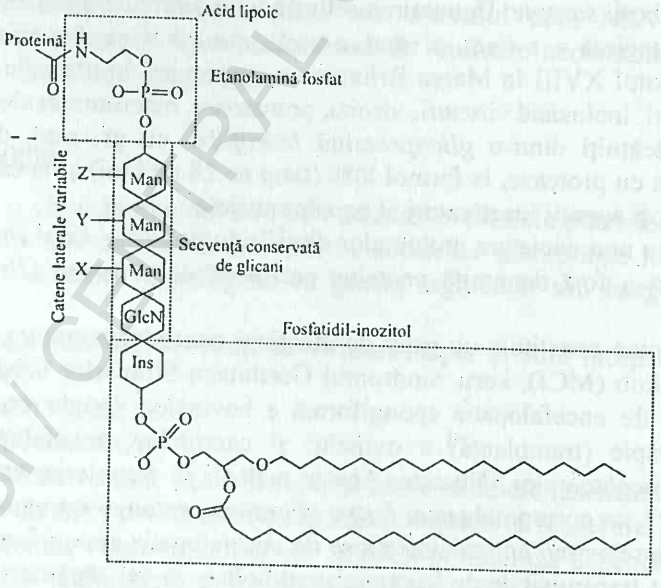
Fracția infecțioasă este, în general, inactivată prin procedee care modifică proteinele: ureea, proteinaza K, SDS (dodecil sulfat de sodiu), fenolul, tripsina, tiocianatul de guanidină.

24.5.1. Proteina neuronală PrP^c

Atât în creierul de hamster infectat experimental cu mojarat de creier de oaie cu maladie prionică scrapie, cât și în creierul pacienților umani cu maladii prionice s-au identificat prin metode fizice, două *izoforme* de proteine prionice.

Proteina prionică neuronală normală (PrP^c) este o sialoglicoproteină, sintetizată în neuronii și în celulele gliale ale SNC, în leucocite și în alte țesuturi în cantități limitate. Denumirea a fost dată de Prussiner și col. (1982). Proteina se sintetizează la nivelul reticulului endoplasmic, este glicozilată în aparatul Golgi și transportată la suprafața neuronilor, unde este "ancorată" de membrana celulară printr-o "ancoră" glicolipidică (glicozil-fosfatidil-inozitol – GPI*) și nu are domeniu citoplasmatic. De aceea, PrP^c se poate elibera de pe suprafața celulei după tratamentul cu enzima bacteriană fosfolipaza C specifică PI (PI-PLC), care clivează regiunea diacil-glicerol a ancorei. De la acest nivel, PrP^c este endocitată și probabil recirculată, fiind în final degradată de proteaze, ca parte a metabolismului celular. PrP^c este transportată din pericarion, prin axon și este localizată în primul rând la nivelul sinapsei, așa cum se evidențiază pe imaginile de imuno-electrono-microscopie. PrP^c este nepatogenă și netransmisibilă. Structura spațială este de tip α-helix, iar funcția este necunoscută.

* GPI constă dintr-un lanț glicanic ce conține etanolamină (legată amidic de aminoacidul C-terminal), glucozamină neacetilată și 3 resturi de manoză legate de inelul de inozitol al fosfatidil-inozitolului (PI), inclus în lama externă a membranei. Un lanț glicanic conservat leagă fosfatul etanolaminei de PI. Partea hidrofobă a PI inclusă în stratul lipidic este formată din catene hidrocarbonate a căror lungime și grad de saturare diferă. GPI este ancoră de legare pentru proteina scrapie, CEA, DAF, CD_{14}, CD_{16}, CD_{58}, CD_{59} etc. Ins = inozitol.



Proteina PrP^c umană conține 253 aminoacizi (254 la șoarece și 264 la bovine). *In vitro*, PrP^c este sensibilă la acțiunea proteazelor. Proteina are două domenii: N-terminal și C-terminal, fiecare de circa 100 aminoacizi. Domeniul C-terminal este pliat în conformație α-helix (3 domenii cu conformație α-helix și o scurtă secvență β-pliată antiparalelă), stabilizată printr-o legătură S-S între helixurile 2 și 3. Molecula are două seturi de glicozilare legate de Asp, iar rolul este incert. Localizarea la suprafața celulei neuronale ar putea să reflecte rolul în aderența celulară, în legarea unui ligand sau o posibilă funcție de semnalizare. Domeniul N-terminal conține o secvență de 8 aminoacizi repetată de

5 ori (octapeptidul repetitiv), bogată în glicină şi prolină, care *in vitro*, leagă Cu* şi Zn. *In vivo*, PrP^c ar putea avea rol în transportul şi metabolismul Cu.

Cuprul pare să aibă un rol esenţial în protecţia SNC faţă de stresul oxidativ şi faţă de maladiile degenerative.

* Cu este un oligoelement esenţial pentru viaţă. Are două grade de oxidare: +1 şi +2. Cu^{2+} este mai stabil. Potenţialul oxidant al cuplului Cu^+/Cu^{2+} funcţionează în diferite reacţii de oxidoreducere, catalizate de enzime dependente de Cu. În exces, Cu este toxic. Dereglarea metabolismului Cu are ca rezultat creşterea ratei de producere a radicalilor liberi. SNC este foarte sensibil la leziunile cauzate de radicalii liberi, pentru că este un ţesut sărac în enzime antioxidante (SOD Cu/Zn, catalază şi peroxidaze) şi bogat în substraturi uşor oxidabile (acizi graşi polinesaturaţi).

În SNC, PrP^c şi ARNm sunt larg distribuite, dar se găsesc în special în neocortex, hipocampus, celule Purkinje şi în neuronii motori spinali. PrP^c este sintetizată în cisternele RE şi, în drumul spre suprafaţa celulei, trece prin cisternele Golgi. În timpul sintezei, este supusă modificărilor post-traducere: clivarea peptidului semnal N-terminal, adăugarea catenelor oligozaharidice N-lincate la două situsuri, formarea unicei legături S-S şi legarea de ancora GPI. Ancora GPI este este adăugată în RE.

Traficul PrP^c a fost studiat pe linii celulare transfectate ce exprimă proteina: PrP^c este reciclată constitutiv între membrana plasmatică şi compartimentul endocitar, din care majoritatea moleculelor sunt reciclate intacte spre suprafaţă, iar restul sunt clivate proteolitic. O parte a moleculelor legate de membrană sunt eliberate în mediul extracelular prin clivajul ancorei GPI. Existenţa căii de reciclare sugerează că o funcţie fiziologică a PrP^c ar fi cea de receptor pentru înglobarea unui ligand extracelular. Un posibil ligand ar fi Cu, care după ce este eliberat în compartimentul endocitar şi transferat altor proteine transportoare, PrP^c s-ar întoarce la suprafaţa celulei pentru a-şi relua ciclul.

A II-a formă este *proteina prionică patologică* (PrP^{sc}). După infecţia experimentală *in vivo*, proteina prionică este produsă de neuroni, astrocite. *In vitro*, un număr mic de linii celulare par a fi sensibile la infecţia prionică (Harris, 1999). Nu se cunoaşte mecanismul prin care proteina patologică este înglobată în celulele sensibile. Celulele infectate produc nivele scăzute de PrP^{sc} rezistentă la proteaze, insolubilă în detergenţi şi infecţioasă.

Analiza celor două proteine prin metode fizice sugerează că conversia PrP^c în PrP^{sc} este conformaţională, nu covalentă. Cele două izoforme au aceiaşi secvenţă primară de aminoacizi, dar creşte cantitativ conformaţia β-pliere, cu o uşoară scădere a conformaţiei α-helix.

Mecanismul conversiei proteinei PrP^c în PrP^{sc} este ipotetic. Chaperonii (proteine ce asistă plierea polipeptidelor în timpul biosintezei şi transportului în organite, previn agregarea proteinelor în timpul stresului, aşa cum este stresul termic) ar fi implicaţi în acest fenomen. Un chaperon ar interacţiona cu capătul C al PrP^c şi astfel proteina normală şi-ar schimba conformaţia. Situsul conversiei ar fi membrana citoplasmatică sau compartimentul endosomal.

24.5.2. Originea şi apariţia prionilor

Prionii au 2 origini: *endogenă şi exogenă* (infecţioasă).

Originiea exogenă a prionilor a fost demonstrată experimental de Bassler (1986), prin inocularea intracerebrală a hamsterilor cu mojarat de creier de oaie, cu boala scrapie.

Proteina patologică PrP^{sc} endogenă ar putea avea două provenienţe:

– prin *reciclarea proteinei celulare*, proces în care se face conversia PrP^c la PrP^{sc};

– prin *mutaţia punctiformă a genei Prn-p*, codificatoare a proteinei normale.

Mutaţiile punctiforme, extrem de rare la nivelul genei Prn-p, au drept consecinţă formarea unei proteine prionice modificate, denumită după numele bolii la care a fost studiată, *PrP scrapie sau* PrP^{sc}. Denumirea a fost păstrată pentru agenţii patogeni (prioni) ai tuturor maladiilor din această familie, deoarece mecanismul a fost demonstrat ca fiind comun, inclusiv în cazul maladiilor prionice umane.

Studiul secvenţei aminoacizilor la cele două tipuri de proteine a demonstrat prezenţa a peste 18 tipuri de mutaţii punctiforme. Cele mai frecvente sunt cele care determină înlocuirea aminoacidului 66 (glicocol din PrP^c, cu prolina în PrP^{sc}, sau a aminoacidului 102 (leucina) din PrP^c, cu prolina în PrP^{sc}.

Prusiner şi Hsiao (1988) au stabilit existenţa unei relaţii directe între mutaţii şi maladie, evidenţiind prezenţa acestora în structura PrP^{sc} la toţi pacienţii cu maladii prionice.

Maladia prionică moştenită poate să fie rezultatul destabilizării conformaţiei PrP^c, ceea ce predispune molecula la tendinţa de agregare sau o mutaţie uşurează interacţiunea dintre PrP^c şi PrP^{sc}.

Există o relaţie directă între proteina normală şi cea patologică (fig. 452). Proteina Prp^{sc}, mutantă sau de origine infecţioasă, *acţionează asupra echivalentului său celular* normal PrP^c, în sensul că, venind în contact cu aceasta, determină deplierea ei de la forma normală de *α-helice* şi replierea ei într-o conformaţie nouă, de tip *β-pliere*. În timpul infecţiei prionice are loc o interacţiune fizică înalt specifică între PrP^c şi PrP^{sc} şi se produce *conversia conformaţională* a proteinei, care face PrP^{sc} rezistentă la degradarea cu proteaze şi îi conferă caracterul infecţios şi patogen.

Pe de altă parte, PrP^{sc} poate să rezulte printr-o mutaţie de *inserţie*, care determină expansiunea regiunii octapeptidului repetitiv, asociată cu maladia prionică moştenită.

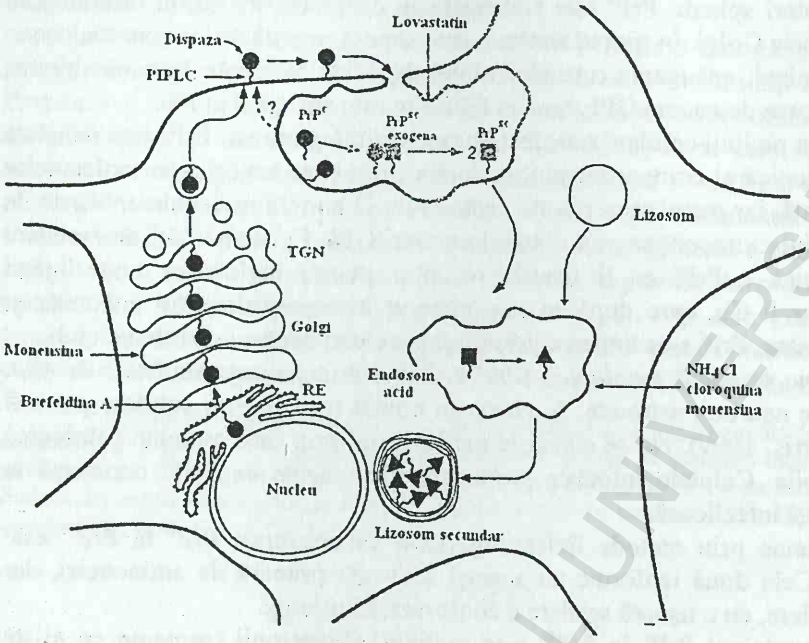
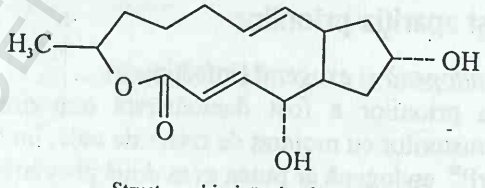


Fig 452. Căile sintezei şi degradării proteinei prionice în celulele cultivate. Pătratele simbolizează PrP^{sc} (proteina *scrapie*), iar cercurile semnifică PrP^c (proteina prionică). PrP^c, precursorul PrP^{sc}, este sensibilă la digestia cu dispază sau cu PIPLC adăugate în mediu. PrP^c este endocitată, în condiţii normale fiind recirculată şi ulterior degradată de proteaze, ca parte a metabolismului celular. Într-un proces infecţios, are loc interacţiunea PrP^c cu proteina PrP^{sc} exogenă (infecţioasă), în cursul căreia PrP^c este convertită la proteina patologică, fără implicarea reticulului endoplasmic şi a cisternelor Golgi. În celulele cultivate, dar nu în creier, capătul N-terminal al PrP^{sc} este clivat ulte-rior, în endosomul acid, cu formarea PrP 27–30 (triunghi) şi acumularea acesteia în lizosomul secundar. PIPLC = fosfolipaza C ce clivează specific PI (după Prussiner, 1996).

Brefeldina, produsă de *Penicillium brefeldianum*, este un antibiotic macrolid utilizat pentru studiul traficului membranar şi al dinamicii organitelor. Blochează translocaţia proteinelor din RE în cisternele Golgi. Dispaza este o protează ce clivează fibronectina, colagenul de tip IV şi mai puţin colagenul tip I. Enzima clivează specific legăturile leucină-fenilalanină. Lovastatin este un medicament din clasa statinelor, administrat pacienţilor cu hipercolesterolemie ca agent hipolipidemic. Este sintetizat de *Pleurotus ostreatus* (ciuperca stridie), care conţine 2,8% lovastatin din greutatea uscată. Lovastatin este un inhibitor al 3-hidoxi-3-metil-glutaril-CoA reductazei, o enzimă ce catalizează conversia HMG- CoA la mevalonat. Mevalonatul este un precursor al colesterolului.



Structura chimică a brefeldinei

PrP^{sc} se extrage din creierul bolnav sub formă agregată, insolubilă în detergent, neadecvată analizei prin tehnicile de rezoluţie structurală înaltă. Totuşi, se acceptă conversia *conformaţională* a PrP^c în PrP^{sc}. Cele două variante ale proteinei au aceiaşi secvenţă de aminoacizi. Schimbarea conformaţiei presupune o creştere cantitativă substanţială a structurii *β-pliere*, cu o uşoară descreştere a structurii *α-helix*. PrP^c are circa 42% structură α-helix şi 3%, β-pliere, iar PrP^{sc} are 30% structură α-helix şi 43%, β-pliere.

Mecanismul formării PrP^{sc} (adică 'replicarea prionilor') poate fi diferit pentru formele *infecţioase* şi pentru cele *genetice*.

Inocularea experimentală a animalelor sensibile cu diluţii foarte mari de omogenat de creier infectat cu scrapie, sau de la bolnavi cu maladia Creutzfeldt-Jakob, a evidenţiat că în creierul acestora

se acumulează mari cantități de prioni (până la 10^8 DL_{50} unități infecțioase). *In vitro*, numai unele linii celulare neuronale sunt sensibile la infecția cu prioni scrapie.

PrP^{sc} de origine exogenă (infecțioasă) are rolul de catalizator pentru conversia PrP^c endogen, la starea PrP^{sc}. Prionii de proveniență *exogenă* interacționează cu moleculele normale de proteină prionică celulară (PrP^c), pe măsură ce acestea sunt sintetizate, imprimându-le propria lor conformație specială (tip β-pliere), transformându-le în proteine prionice (PrP^{sc}). Fiind rezistente la degradarea enzimatică, proteinele prionice se acumulează în neuroni, determinând vacuolizarea și necroza lor. Prionii eliberați pe această cale, sunt adsorbiți pe neuronii normali adiacenți, determinând extinderea procesului patologic. Locul neuronilor lizați este luat de celulele gliale.

În ceea ce privește *prionii de origine endogenă*, PrP^{sc} este rezultatul mutațiilor punctiforme multiple care se produc în gena codificatoare a proteinei normale (Prn-p). Astfel, proteina normală este transformată spontan în proteina patologică PrP^{sc}.

24.5.3. Transmiterea experimentală a prionilor

Prionii reprezintă forma modificată a unei proteine celulare normale (PrP^c). Prusiner (1986, 1993) a demonstrat originea *exogenă* a proteinei prionice prin *transmiterea experimentală a maladiilor prionice*. Transmiterea interspecifică a prionilor este un proces întâmplător, cu o perioadă lungă de incubație (de ordinul anilor), fiind limitată de bariera de specie. La pasajul primar al prionilor de la specia A la specia B, nu toate animalele inoculate ale speciei B fac boala, iar perioada de incubație este lungă. Transmiterea de la oaie la capră, prin injectarea mojaratului de creier, s-a demonstrat în 1936. Eficiența barierei de specie poate fi cuantificată prin durata perioadei de incubație, dar mai ales prin studii de titrare comparativă, adică prin diluarea inoculului și compararea valorilor DL_{50}.

Agentul etiologic a rămas necunoscut și Sigurdson (1954) a folosit termenul de "infecție virală lentă". Prin pasaje succesive la indivizi ai aceleiași specii, timpul de incubație se scurtează progresiv de la un pasaj la altul și propagarea devine predictibilă.

Bariera de specie nu funcționează (sau nu funcționează totdeauna) și are importanță practică pentru *evaluarea riscului* ca omul să dezvolte maladia Creutzfeldt-Jakob, după consumul creierului de oaie infectată cu scrapie sau de bovine infectate cu prionul encefalopatiei spongiforme.

După inoculare, perioada de incubare este de 1–3 ani. Odată declanșate, bolile prionice au o evoluție clinică cu agravare progresivă de-a lungul mai multor luni sau ani, care duce invariabil la moarte. Experiențele pe oi și capre, prin inoculare *intracerebrală, orală, subcutanată, intramusculară* sau *intravenoasă*, au arătat existența gradelor diferite de sensibilitate a diferitelor rase de animale, mai ales după inocularea subcutanată, ceea ce sugerează că fondul *genetic* influențează decisiv sensibilitatea la infecția prionică. Adeseori, multe dintre animalele inoculate, nu dezvoltă maladia.

24.5.4. Patogenitate

Prionii produc o varietate de *boli neurologice degenerative*, care afectează ovinele și caprinele (maladia scrapie), bovinele (encefalopatia spongiformă sau boala "vacii nebune"), felinele, cervidele, nurcile etc., precum și omul. Bolile prionice sunt limitate la SNC și evoluează cu leziuni degenerative tipice pentru *encefalitele spongiforme*:

- degenerarea spongiformă a substanței cenușii, ce poate să apară la toate etajele encefalului;
- vacuolizarea și necroza neuronilor;
- reacții astrogliale cu hipertrofia astrocitelor și proliferarea lor în cortex (poate fi însoțită de plăci de amiloid). Datorită focarelor multiple de liză neuronală, apar "găuri" care conferă creierului un aspect spongios. La unele organisme se observă depunerea unor plăci de amiloid (colorabile cu roșu de Congo), în SNC. Ele ar putea fi formate din proteine prionice sau din agregate de prioni.

Maladiile prionice pot avea cauze *infecțioase* (agentul prionic este de origine exogenă) sau are origine endogenă (formele *ereditar-familiale* și *sporadice*). Formele sporadice apar spontan în populație, fără nici o cauză aparentă. Prionii maladiilor familiale și sporadice sunt infecțioși și pot fi transmiși prin inocularea mojaratului de creier la organisme ale aceleiași specii sau ale unei specii înrudite.

Maladia scrapie (tramblanța) apare în populații de ovine și caprine, cu predispoziție genetică, dar faptul că se poate propaga prin inoculare, respinge ideia caracterului pur genetic. Boala se instalează după 2–5 ani de la contaminare, cu tulburări neurologice: prurit intens, dificultate în mers (prin hipoplazia cerebelului), cu agravare progresivă, până la imobilitate totală, cu sfârșit letal. Principalele leziuni apar însă în creier, care degenerează lent.

Infecția naturală se face pe *cale digestivă* cu proteine prionice din ingredientele de origine animală. Rezistența prionilor la proteaze permite păstrarea infecțiozității în tractul digestiv. Nu se cunoaște mecanismul prin care prionii depășesc bariera intestinală, dar ar putea fi implicate celulele M. Inițial, infecția evoluează la nivelul sistemului limfoid (plăcile Peyer și splină). PrP^{sc} se acumulează în celulele foliculare dendritice (celule cu viață lungă), prin intermediul cărora prionii sunt diseminați în splină. Din țesutul limfoid, proteina prionică invadează SNC, pe calea fibrelor vegetative ale țesutului limfoid, cu răspândire retrogradă spre măduva spinării sau pe calea vagului la trunchiul cerebral. Replicarea prionilor în SNC se face cu o rată înaltă până la apariția simptomelor clinice. La primatele și ovinele infectate experimental cu agentul ESB, proteina prionică s-a detectat la nivel scăzut, în sânge. Proteina prionică sanguină a ovinelor este infecțioasă și se poate transfera intraspecific. Apariția maladiei trebuie urmată de sacrificarea întregului efectiv de animale.

Maladiile prionice umane au fost clasificate în câteva tipuri: boala Creutzfeldt-Jacob (CJD), sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insomnia familială letală (IFL) și kuru. Sunt maladii rare (1–2 cazuri/un million/an), dar au fost studiate datorită particularităților agentului etiologic și de teama că ESB ar putea să constituie un risc de sănătate publică prin consumul țesuturilor animale infectate.

Maladiile prionice sunt *exogene* (de natură infecțioasă) sau *endogene*, adică sunt moștenite prin predispoziție genetică, iar altele au caracter *sporadic* (apar fără cauze cunoscute). Formele sporadice nu au etiologie infecțioasă sau genetică și se pot atribui *conversiei spontane* a PrP^{c} la starea PrP^{sc} sau existenței unei mutații somatice nedetectate în proteină, ce favorizează conversia la PrP^{sc}.

Formele *infecțioase* ale maladiei prionice sunt rezultatul transmiterii orizontale a prionilor infecțioși. Cele mai cunoscute sunt boala "kuru" și boala Creutzfeldt-Jacob.

Boala Creutzfeldt-Jacob (CJD) are o frecvență de 1 la un milion și apare în jurul vârstei de 60 de ani, cu mișcări anormale, rigiditate, tulburări psihice de tip demențial. Apare *sporadic* (caracter ereditar-familial), datorită unor evenimente rare de mutație somatică a genei Prn-p) sau prin *infecție exogenă*, după unele practici medicale (iatrogenice) (transplantul de cornee sau de duramater, injecții de hormoni hipofizari, în special a celor de creștere, obținuți din hipofiza umană recoltată de la cadavre, după implantarea electrozilor contaminați pentru EEG sau prin operații chirurgicale cu instrumente contaminate). Transmiterea prin infecție exogenă este argumentată de apariția maladiei prionice la persoane foarte tinere. Varianta nouă a CJD (nCJD) pare să se transmită pe cale digestivă, prin consumul cărnii de la bovinele cu encefalopatie spongiformă. Deși propagarea interspecifică a prionilor este un eveniment aleatoriu și are o frecvență mică, PrP^{sc} a fost transmisă la bovine prin hrănirea cu făină rezultată de la ovinele cu scrapie, la care produce encefalopatia spongiformă (BSE). BSE s-a transmis la om, pe cale digestivă sub forma nCJD. Această modalitate de propagare a fost confirmată prin analiza secvenței aminoacizilor prionilor BSE și CJD. Intre '95–2000 au fost înregistrate 51 cazuri de nCJD. În contrast cu CJD clasic, nCJD a apărut la persoane tinere, pentru că maladia la persoanele în vârstă poate fi mascată de demența senilă.

Boala *kuru** afectează exclusiv populația tribului Fore din Papua-Noua Guinee și este caracterizată prin pierderea coordonării motorii, accentuată progresiv, astfel încât bolnavii necesită sprijin atât așezați, cât și în poziție verticală. Trăsătura clinică principală a maladiei este ataxia cerebeloasă. În contrast cu CJD, demența este mai puțin evidentă. Maladia se transmite pe cale digestivă, datorită canibalismului ritual (cinstirea înaintașilor prin consumul creierului cadavrelor).

* Termenul "kuru" reflectă principalele simptome ale bolii și este tradus prin "a tremura de frică, 'a se infiora' sau 'moartea zâmbind'.

Sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) este o varietate naturală a bolii Creutzfeldt-Jacob, caracterizată prin instalarea precoce a incapacității de coordonare a mișcărilor, prin leziuni cerebeloase și demență.

Insomnia familială letală (IFL) debutează cu tulburări ale somnului şi ale sistemului nevos vegetativ, urmate de demenţă.

Descoperirea mutaţiilor în genele PrnP la bolnavii cu CJD, GSS şi IFL, a dus la concluzia că bolile prionice sunt atât genetice cât şi infecţioase.

Diagnosticul maladiilor prionice este histologic. Nu se produc modificări serologice. Proteina patologică poate fi detectată cu AMC, în biopsiile de ţesut limfoid.

Semnificaţie biologică. Existenţa prionilor (proteine infecţioase, replicabile pe o cale neobişnuită), a sugerat posibilitatea transmiterii unor maladii infecţioase în absenţa unui transfer de material genetic codificator al sintezei proteice, ceea ce este în contradicţie cu dogmele *biologiei moleculare*, ale virologiei şi microbiologiei.

Ideia că o proteină este capabilă de autoreplicare printr-o interacţiune proteină-proteină, în absenţa informaţiei genetice şi a circulaţiei ei în celulă, după modelul clasic, este greu de acceptat.

Chesebro şi Fields (1996) consideră că este posibil ca PrP (proteina rezistentă la proteaze) să aibă un rol important în patogeneza maladiei, fără să fie agentul cauzal. Ea ar funcţiona ca un receptor sau ca un cofactor necesar pentru agentul cauzal sau pentru un virus ubicvitar, cu mare rezistenţă la inactivare.

Modificarea structurală a PrP^{c} la PrP^{sc} ar putea fi rezultatul acţiunii unei proteine necunoscute, cu rol de *chaperonină* (Guillemet şi col., 1996). Chaperonii sunt proteine care facilitează plierea polipeptidelor în timpul biosintezei şi transportului în organite şi împiedică agregarea proteinelor în condiţiile stresului celular (ca de exemplu, şocul termic). Chaperonii acţionează prin legarea de substratul lor, uneori dependentă de ATP şi împiedică formarea intermediarilor pliaţi, nefuncţionali. Formarea PrP^{sc} implică modificarea plierii şi agregarea moleculelor, procese în care chaperonii au rol important.

Este posibil ca prezenţa prionilor să fie mult mai largă în natură, şi oricum, nelimitată strict la mamifere.

După Prusiner (1995), este posibil ca mai multe boli nervoase cronice (demenţa presenilă umană de tip Alzheimer, maladia Parkinson, scleroza multiplă, scleroza laterală amiotrofică etc.), cu etiologie necunoscută, să fie produse sau influenţate în evoluţie, de intervenţia unor agenţi patogeni subvirali, de tipul prionilor.

Bolile prionice exemplifică un mecanism de patogenitate bazată pe schimbarea conformaţiei unei proteine care se autopropagă. Probabil că transmiterea informaţiei biologice pe calea conformaţiei proteinei este un fenomen mai general în natură. La levuri şi la fungii filamentoşi s-au identificat proteine care se comportă ca prioni (Harris, 1999).

Bibliografie

Prusiner B. S. 1990. PrP Gene Structure, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Prusiner B.S. 1996. Prions, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.r

Harris D.A. 1999. Cellular Biology of Prion Diseases. Clin. Microbiol. Rev. 12(3) : 429–444.

Chesebro B. 1990. Spongiform Encephalopathies: The Transmissible Agents, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Weissmann C. 1991. A 'unified theory' of prion propagation – Nature, vol. 352: 22: 679–682.

Polish L. B., Gallagher M., Fields H. A., Hadler S. C. 1993. Delta hepatitis: molecular biology and clinical and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 6, 211–229.

Aiken J. M., Marsh R. F. 1990. The search for scrapie agent nucleic acid – Microbiol. Rev. 54(3): 242–246.

Collinge J. 2009. Human Prion Diseases, în vol. Principles and Practices of Clinical Virology, sixth edition, Ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, Barry D. Schoub, Paul D. Griffith, Philip Mortimer, John Wiley & Sons, Ltd.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

25. VACCINURI VIRALE

Vaccinurile virale pot fi *atenuate, inactivate* (ambele sunt unitare), *subunitare* şi obţinute prin *tehnologia ADN recombinant.*

Vaccinurile cu *virus atenuat* se obţin din tulpinile virale lipsite complet sau aproape complet de patogenitate. Atenuarea este un complex de modificări genetice care duc la pierderea virulenţei agenţilor infecţioşi, dar îşi păstrează capacitatea de a induce un răspuns imun protector de durată la gazdele sensibile. Atenuarea este parte a evoluţiei naturale a agenţilor infecţioşi, dar este utilizată pentru a crea vaccinuri infecţioase. Fiind infecţioase, ele se multiplică în organismul vaccinat şi produc o stimulare antigenică continuă, într-un interval de timp.

Vaccinarea cu virusuri atenuate conferă o imunitate de durată, după administrarea unei singure doze.

25.1. Metode de atenuare a virulenţei virale

1) *Pasajul virusului* de origine umană într-un substrat "nenatural", *in vivo* sau *in vitro.* Cele mai importante vaccinuri pentru om şi animale s-au obţinut pe această cale. Virusul se cultivă în mod repetat, prin inoculare la organisme sănătoase sau în culturi primare de celule: virusul febrei galbene s-a inoculat la şoarece şi apoi în embrionul de găină; poliovirusul s-a inoculat în celulele de rinichi de maimuţă; virusul rujeolei – în fibroblaste de embrion de găină. Pasajul într-un substrat celular "nenatural", selecţionează mutante printr-un cumul de evenimente mutaţionale întâmplătoare. În practica vaccinării, se utilizează cele cu proprietăţi adecvate de atenuare şi imunogenitate. Mutantele care după administrare rămân localizate la poarta de intrare, sunt cele mai utile. Unul dintre marile succese ale acestei metode de atenuare este vaccinul *polio.* Prin pasaje succesive în culturile celulare de rinichi de maimuţă, s-a selectat o linie lipsită de neurovirulenţă, după inocularea intracerebrală sau intraspinală la maimuţă. Vaccinul *rubeolic* s-a obţinut prin cultivarea virusului pe acelaşi substrat, iar liniile folosite ca vaccin *rujeolic* şi al *febrei galbene* s-au cultivat pe fibroblaste de embrion de găină.

2) *Vaccinarea cu un virus înrudit,* de la o altă specie gazdă. Cel mai vechi vaccin viral (Jenner, 1798), utilizat în controlul variolei, este virusul vaccinal, recoltat din leziunile pustulare de pe ugerul vacii. Virusul vaccinal imunizează încrucişat cu virusul variolei (smallpox) şi este protector faţă de infecţia variolică.

Virusul rujeolei imunizează câinele faţă de virusul bolii Carré. Anticorpii faţă de virusul rujeolei neutralizează virusul bolii Carré, dar nu şi invers.

Calea de abordare a lui Jenner pentru obţinerea preparatelor virale utilizabile ca vaccinuri umane este folosită şi astăzi şi implică izolarea unor virusuri de la mamifere sau de la păsări, înrudite antigenic cu diferite virusuri umane. Pasajul lor în celulele diploide umane (CDU) *in vitro,* echivalează cu procesul atenuării. Celulele diploide umane reprezintă un substrat semipermisiv pentru virusurile umane şi mamaliene şi adeseori, multiplicarea lor este lipsită de eficienţă.

Genele virusurilor mamaliene şi aviare, care determină spectrul de gazdă au o mare diversitate a secvenţelor de nucleotide, faţă de genele corespunzătoare ale virusurilor umane. Efortul de a realiza noi vaccinuri, pe calea clasică a lui Jenner, trebuie să se sprijine pe tehnicile de genetică virală, biologie moleculară şi imunologie.

3) *Inocularea virusului patogen* sau parţial atenuat, pe o cale "nenaturală", adică alta decât cea prin care virusul pătrunde în mod obişnuit în organism. Metoda este folosită pentru vaccinarea

animalelor (de exemplu, virusul laringotraheitei păsărilor, se administrează prin instilare în ochi). Pentru om, metoda nu se foloseşte, deoarece riscul infecţiei este mare.

Vaccinurile atenuate administrate pe cale orală induc un răspuns seric şi un răspuns imun generalizat al mucoaselor, asigurând o rezistenţă superioară la reinfecţie şi persistenţa memoriei.

Vaccinarea cu un preparat viral atenuat echivalează cu o infecţie uşoară, asimptomatică.

Vaccinurile virale atenuate au avantajul important al stimulării ambelor compartimente ale răspunsului imun: celular şi humoral, atât sistemic cât şi local. Acest fapt este deosebit de important pentru infecţiile virale în care imunitatea mediată celular are un rol esenţial în eliminarea virusului, cât şi pentru infecţiile mucoaselor, în care atât imunitatea locală cât şi cea sistemică, sunt necesare pentru rezistenţa optimă.

Vaccinurile virale atenuate stimulează răspunsul imun faţă de fiecare dintre antigenele protectoare ale unui virus. Imunitatea indusă de aceste vaccinuri este mai durabilă, mai eficientă şi are un spectru mai larg de reactivitate încrucişată, decât cea indusă de virusurile inactivate. Reactivitatea încrucişată este foarte importantă pentru virusurile care suferă variaţie antigenică progresivă.

Virusurile atenuate din vaccinuri, păstrându-şi capacitatea de multiplicare în organismul vaccinat, stimulează îndelung SI şi adeseori necesită o singură inoculare. Ele se răspândesc în populaţie şi imunizează chiar indivizi nevaccinaţi.

Vaccinurile atenuate se produc cu un preţ de cost mai scăzut şi se administrează mai uşor. Spre deosebire de alte vaccinuri atenuate, vaccinul polio Sabin necesită reimunizări, pentru că cele 3 tulpini interferă una cu alta în ciclul de multiplicare în celulele intestinale. După prima imunizare, se va multiplica predominant una dintre tulpini şi va stimula imunitatea specifică. După a II-a imunizare, imunitatea generată de prima inoculare va limita tulpina care a dominat anterior şi va favoriza multiplicarea uneia dintre celelalte două tulpini. A III-a inoculare asigură imunizarea faţă de cea de a III-a tulpină.

Dezavantajele vaccinurilor virale atenuate sunt legate de riscul ridicat al *contaminării* cu agenţi infecţioşi supraadăugaţi. De exemplu, loturile iniţiale de vaccin polio au fost contaminate cu SV_{40}, din celulele de rinichi de maimuţă, dar nu s-a constatat creşterea incidenţei tumorilor la copiii vaccinaţi. Vaccinul atenuat al virusului febrei galbene, multiplicat în fibroblastele de embrion de găină, a fost contaminat iniţial cu virusul leucozei aviare.

Unele virusuri atenuate (rujeolic, rubeolic, al febrei galbene) păstrează un nivel scăzut de *virulenţă reziduală*, care determină infecţii la copiii cu imunodeficienţe.

O problemă importantă, legată de infecţiozitatea vaccinurilor atenuate, este aceea a *restaurării* unui grad variabil de virulenţă după vaccinare, care determină infecţii cu manifestări clinice la copiii imunodeficienţi. Procesul infecţios nu este consecinţa alterării genetice a virusului din vaccin. Din această cauză, vaccinul nu se administrează gravidelor.

Vaccinurile atenuate ridică problema *instabilităţii genetice*. Virusul rujeolic atenuat este labil, în special la variaţiile termice şi de aceea necesită un regim termic constant (+4°), pe toată durata depozitării.

Un alt dezavantaj constă în faptul că virusul atenuat poate să producă o infecţie persistentă. De asemenea, administrarea vaccinului atenuat poate să *interfere* cu virusul de tip sălbatic care infectează natural şi să domine până la anulare eficienţa vaccinării. De exemplu, virusul polio atenuat, se administrează pe cale orală, dar poate să interfere cu o largă varietate de enterovirusuri.

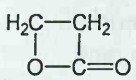
O altă cale de producere a vaccinurilor virale atenuate, genetic stabile, implică obţinerea *mutantelor de deleţie*. Acestea au o capacitate diminuată de multiplicare, ceea ce *echivalează cu atenuarea*. Mutantele prin deleţie trebuie să-şi păstreze infecţiozitatea şi imunogenitatea şi să fie stabile genetic.

25.2. Vaccinuri inactivate

Vaccinurile inactivate conţin virioni care, după tratamentul cu agentul chimic inactivator, nu pot să iniţieze ciclul de multiplicare în substratul permisiv.

Preparatul viral brut se obţine prin cultivarea virusului într-un substrat permisiv: în oul embrionat de găină (virusul influenza), în culturi celulare de rinichi de maimuţă (virusul polio), sau în

fibroblastele embrionare umane şi de embrion de găină (polio, rujeolic, rabic). Preparatul brut se inactivează cu formol, acetil-etilenimina sau cu β-propiolactona.



β-propiolactona

Preparatele virale inactivate, utilizabile ca vaccin au *avantajul* riscului minim al infecției. Rareori, preparatele inactivate conțin virus infecțios rezidual, care a rezistat tratamentului de inactivare, sau care provine din contaminarea cu un alt virus.

Vaccinurile virale inactivate au câteva *dezavantaje*. Uneori, tratamentul cu un agent chimic *anulează imunogenitatea* unor proteine virale, astfel încât răspunsul imun față de virusul inactivat nu este protector. De exemplu, inactivarea cu formol a virusului rujeolic anulează imunogenitatea proteinei de fuziune (F), iar vaccinul își pierde proprietatea protectoare.

Vaccinurile inactivate *nu stimulează imunitatea mediată celular* (mediată de limfocitele Tc), care au rol decisiv în eliminarea celulelor infectate cu virus și în rezistența la infecțiile cu o gamă largă de virusuri.

Prețul de cost al vaccinurilor inactivate este mai mare.

Preparatele virale inactivate, folosite ca vaccinuri, se obțin din virusul rabic cultivat în CDU și în embrionul de rață, din virusul oreionului și din virusul influenza, cultivate în embrionul de găină, din virusul polio, cultivat în celulele de rinichi de maimuță. Toate sunt inactivate cu β-propiolactonă sau cu formol.

Preparatul inactivat al virusului hepatitei B este o realizare recentă, dar este foarte costisitor pentru că virusul nu se cultivă în sisteme celulare *in vitro*, iar tehnicile de purificare a virusului din serul pacienților infectați cronic sunt foarte laborioase.

Unele virusuri – rujeolic, oreionului, rubeolei, variolei sunt stabile antigenic și sunt adecvate preparării și administrării vaccinurilor. Dar nu totdeauna un virus stabil antigenic este adecvat pentru o vaccinare de succes, deoarece virusurile au numeroase modalități de evaziune a RI.

Succesul vaccinării se corelează, în general invers, cu gradul variației antigenice a virusului. Prin variație antigenică se înțelege faptul că diferite izolate ale aceluiași virus au un grad diferit de reactivitate încrucișată cu un ser standard. Vaccinurile cu virusul rujeolei, oreionului, rubela au scăzut incidența infecției spre 0, dar nu există vaccin pentru VRS. Nu toate virusurile stabile antigenic pot furniza vaccinuri eficiente, deoarece posedă mecanisme prin care scapă acțiunii efectorilor imunitari: unele rămân ascunse în SNC, altele induc sinteza unor citokine ce blochează semnalizarea imunitară, sau a unor proteine cu aceiași funcție (Air și colab., 2008).

25.3. Vaccinuri subunitare

Inițial, vaccinurile s-au obținut din preparatele brute de virus, după multiplicarea lor într-un țesut (*in vivo*) sau în culturi celulare. Pe măsură ce a fost posibilă obținerea unor titruri înalte de virus, în scopul diminuării toxicității vaccinului, s-a trecut la purificarea virusului și a unor componente virale.

Vaccinurile subunitare conțin *proteine virale* în care se găsesc localizate situsuri antigenice majore și care se pot substitui virionilor în practica vaccinării. De exemplu, pentru virusul influenza, vaccinul subunitar conține antigenele de suprafață HA și NA. Preparatul este mai puțin toxic decât virusul integral inactivat, dar este mai puțin eficient în stimularea răspunsului imun. Proteinele F și G ale RSV s-au purificat din virusul cultivat *in vitro*.

Celulele mamaliene reprezintă un sistem optim pentru producerea proteinelor virale, utilizabile ca vaccinuri subunitare. Celulele în cultură se infectează cu virus și din lizatele celulare se purifică antigene proteice. În lizate se găsește o cantitate mare de proteine virale în exces, neîncorporate în virioni.

Obținerea vaccinurilor subunitare proteinice virale, în culturile de celule animale ridică probleme dificile de purificare a proteinelor virale, din amestecul cu proteinele celulare. Dacă se folosesc linii celulare continue, trebuie îndepărtat ADN celular, potențial oncogen.

25.3.1. Tehnici moderne de obținere a vaccinurilor subunitare

Dezvoltarea biologiei moleculare și cunoașterea mecanismelor RI, a stimulat preocupările privind obținerea unor vaccinuri noi. Genele codificatoare ale antigenelor au fost clonate prin *tehnologia ADN recombinant* (tehnicile de inginerie genică).

Vaccinurile obținute prin tehnologia ADN recombinant conțin proteine în care sunt localizați epitopii imunodominanți protectori ai agentului infecțios. Genele codificatoare ale antigenelor suprafeței virale, bacteriene și ale protozoarelor, se pot izola după fragmentarea genomului sub acțiunea catalitică a *enzimelor de restricție*. Prin tehnologia ADN recombinant, genele se inseră în celula procariotă (*E. coli, B. subtilis*), sau în celule bacteriene sau eucariote (levuri, celule de insecte sau mamaliene).

Fragmentarea genomului cu endonucleaze de restricție este posibilă numai pentru dezoxiribovirusuri. Genomul ARN trebuie mai întâi transcris în ADNc și ulterior poate fi utilizat în tehnicile de ADN recombinant. Genomul ARN de polaritate pozitivă este adecvat scopului clonării, dar nu a fost clonat ADNc al unei catene de ARN de polaritate negativă.

Celulele de mamifere reprezintă substratul optim pentru clonarea genelor și pentru producerea proteinelor virale, deoarece plierea, transportul celular și prelucrarea proteinelor sunt asemănătoare celor ce au loc în celula infectată de virusul natural. Celulele produc cantități mari de antigen viral, codificate de gena clonată.

Tehnicile de clonare genică se folosesc pentru sinteza proteinelor unor virusuri, care nu se multiplică *in vitro*, în sistemele celulare uzuale. De exemplu, gena pentru sinteza antigenului HBs a fost inserată într-o plasmidă și clonată de levuri. Proteina virală este neglicozilată, dar este imunogenă pentru om și induce sinteza anticorpilor protectori față infecția naturală. S-au clonat genele codificatoare ale glicoproteinelor de HSV, VEB, HIV, VRS (virusul respirator sincițial).

ADN viral este funcțional chiar în celula procariotă, după transferul prin intermediul unui vector (plasmida sau fag). Astfel s-au sintetizat antigene de poliovirus, antigenul HBs, antigenul virusului hepatitei A, HA și NA ale virusului gripal.

Pentru purificarea glicoproteinelor virale din celulele infectate în care a fost clonată gena, s-a folosit *tehnica cromatografiei de afinitate cu anticorpi monoclonali* (AMC) sau alte tehnici de separare (cromatografia cu lectine, tehnici de separare fizică).

O variantă a tehnicilor de ADN recombinant este aceea de obținere a vaccinurilor cu *virusul vaccinal hibrid*. Genomul poxvirusurilor conține circa 200 de gene. Unele sunt esențiale pentru multiplicarea virală, dar un interes deosebit prezintă genele neesențiale pentru ciclul de multiplicare. Cele neesențiale reprezintă circa 30% din genom și sunt grupate la extremitățile genomului ADN dublu-catenar linear. În plus, genomul este împachetat lax în virion. Aceste particularități au permis obținerea, prin tehnicile de inginerie genică, a *poxvirusurilor recombinate*, infecțioase, capabile să exprime genele străine inserate în genomul lor.

ADN viral este inserat în genomul virusului vaccinal prin recombinare la situsuri omologe. Virusul vccinal hibrid se multiplică în celulele permisive și genele inserate în genomul său codifică antigenul HBs, antigenul rabic, antigenul HSV etc.

Vaccinurile virale hibride sunt stabile și stimulează ambele compartimente ale răspunsului imun.

Antigene peptidice sintetice. Utilizarea AMC a făcut posibilă identificarea epitopilor cu rol esențial în stimularea răspunsului imun. Producerea și utilizarea antigenelor sintetice s-a impus după demonstrarea bazelor moleculare ale imunogenității și după studiile privind proprietățile imunogene ale antigenelor artificiale. Pe de altă parte, s-a demonstrat ca macromoleculele proteice sau glicoproteice din structura virusurilor și a microorganismelor infecțioase, au un număr mare de determinanți antigenici, dar numai un număr limitat dintre aceștia au semnificație imunogenă și un număr foarte mic sunt inductori ai răspunsului imun protector.

Sinteza artificială a peptidelor a devenit posibilă după introducerea metodelor de secvențiere a ADN. Cunoașterea secvenței bazelor a permis dirijarea secvenței de aminoacizi a proteinelor cu activitate biologică.

Vaccinurile sintetice conțin secvențe polipeptidice sintetizate pe cale chimică. Ele includ determinanți antigenici esențiali pentru inducerea unui răspuns imun protector față de agenții patogeni corespunzători.

Condiția esențială pentru obținerea vaccinurilor sintetice este cunoașterea structurii chimice a determinanților antigenici nativi ai virusului (sau ai microorganismelor patogene) și identificarea regiunilor imunodominante ale moleculei.

Tehnicile de cristalografie cu raze X, cromatografia în faza lichidă, au permis identificarea situsurilor antigenice majore ale unor virusuri foarte importante pentru clinică. De exemplu, s-a

determinat structura tridimensională a hemaglutininei virusului gripal şi s-au identificat *regiunile calde ale moleculei*, care, cu mare probabilitate, corespund determinanţilor antigenici.

S-a stabilit secvenţa aminoacizilor, care a fost reprodusă în proteinele sintetizate artificial.

Marea majoritate a peptidelor sintetice sunt secvenţe scurte, lineare de aminoacizi, care reproduc un fragment din structura primară a moleculei proteice. Dezavantajul major este că secvenţele sintetice nu reproduc configuraţia spaţială a determinanţilor antigenici naturali, în special a celor discontinui. Aceştia sunt alcătuiţi din resturi de aminoacizi neadiacenţi în structura primară a moleculei, dar pot fi juxtapuşi în structura tridimensională a proteinei pliate. Astfel se explică slaba imunogenitate a peptidelor sintetice. Ameliorarea calităţilor de imunogenitate ale peptidelor sintetice, utilizabile ca vaccinuri, depinde de gradul de asemănare a conformaţiei lor, cu determinantul antigenic nativ.

Dimensiunile mici ale peptidelor sintetice impun cuplarea lor cu o moleculă purtător, pentru creşterea gradului de imunogenitate. S-a folosit hemocianina de *Megathura* (KHL), cuplată prin intermediul glutaraldehidei sau a unei grupări tiol a unui rest de cisteină, adăugat la o extremitate a secvenţei sintetice.

S-au sintetizat peptide care reproduc secvenţe de aminoacizi ale unor polipeptide ale virusului hepatitei B, cu diferite eficienţe imunoprotectoare, precum şi peptide care reproduc unele secvenţe ale hemaglutininei virusului gripal.

Polipeptidele sintetice utilizate ca vaccinuri, au avantajul că nu conţin alte componente care ar putea produce efecte secundare şi stimulează răspunsul imun strict specific faţă de epitopii antigenici critici ai agentului infecţios. Sunt stabile indefinit şi se produc la un preţ de cost scăzut. Au însă dezavantajul major de a nu stimula răspunsul imun mediat celular.

Vaccinurile ADN. O strategie recentă a terapiei genice (Roitt, 2007) implică legarea ADN încărcat negativ de lipidele cationice, care s-ar ataşa de suprafaţa încărcată negativ a celulelor vii şi ulterior ar fi endocitat de celule. Injectarea preparatului fără lipide arată o rată mai înaltă de înglobare a ADN şi expresia proteinei codificate. Astfel s-a născut tehnologia vaccinării cu *ADN nud.*

Metoda constă în injectarea directă a acidului nucleic (ARN sau ADN) codificator al proteinelor antigenice de interes clinic, în *muşchiul scheletic,* unde codifică îndelung proteina. Iniţial s-a injectat ADN al genei *luciferazei* şi proteina a fost sintetizată.

Vaccinul ADN constă dintr-o genă ADNc, cu o secvenţă terminală poli-A, un promotor viral şi o secvenţă CpG bacteriană, clonată într-o plasmidă bacteriană. ADN este prelucrat *in vitro* pentru expresia optimă în celulele eucariote: plasmida necesită o *origine a replicării* (ce permite multiplicarea în celula bacteriană, *E. coli*); o *genă de rezistenţă* la antibiotice (ampicilină), care permite selecţia celulelor purtătoare de plasmidă pe mediul cu antibiotic; un *promotor viral* (din CMV sau SV_{40}) pentru expresia optimă în celulele mamiferelor. ARNm trebuie să fie stabil.

Celula pivot care prezintă Ag este CD, care poate fi transfectată direct sau poate să endociteze direct Ag eliberat de celulele musculare în spaţiile interstiţiale şi poate înghiţa celulele lezate sau moarte după injectarea ADN. Prin intermediul TLR 9, secvenţele CpG stimulează sinteza IFNα şi β, IL-12, stimulatoare ale IMC via Th_1 şi a IMH.

Pentru cele mai multe infecţii bacteriene, protecţia primară este mediată de IMH. Pentru infecţiile intracelulare (*M. tuberculosis., L. monocytogenes*), protecţia este mediată de IMC. Protecţia anti-HIV, herpes, malarie este conferită de IMH şi IMC. Antigenele exogene (din agenţii patogeni inactivaţi) sau proteinele derivate din vaccinurile vii sunt endocitate de CPA şi prezentate de moleculele CMH II. Moleculele sintetizate în celulă sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH I.

Vaccinul ADN se aseamănă, funcţional, cu vaccinul atenuat, pentru că stimulează IMH şi IMC. ADN este eliberat în celulă, transcris şi celula secretă Ag codificat.

Cantitatea de Ag produs *in vivo*, după inocularea ADN este cuprinsă între *ng* şi *pg*.

Sunt cel puţin 3 mecanisme prin care Ag codificat de ADN plasmidial este prelucrat şi prezentat pentru a stimula RI:

- stimularea directă de către celulele *somatice* (miocite, keratinocite sau alte celule negative pentru CMH II);
- transfecţia directă a CPA profesioniste (CD);
- stimulare încrucişată, în care ADN plasmidial este preluat prin transfecţie de celule somatice şi/sau de CPA profesioniste, iar proteinele secretate sunt preluate de alte CPA profesioniste şi prezentate celulelor T.

AND plasmidial pare să se integreze în ADN cromosomal sau este menținut perioade lungi sub formă episomală. Antigenul este exprimat nu numai de celulele musculare, ci și de celulele dendritice din zonă care înglobează ADN plasmidial. Ulterior s-a injectat plasmida codificatoare a nucleoproteinei de virus gripal și a indus răspunsul imun protector față de infecția letală cu virusul influenza. Tehnologia se extinde pentru obținerea vaccinului față de alți agenți patogeni. Administrarea intranazală a plasmidei cu ADN HSV a protejat semnificativ mucoasa orală.

Vaccinurile ADN pot fi utile în infecțiile virale la care stimularea IMC cu activarea limfocitelor Tc este esențială pentru protecție, dar administrarea vaccinului atenuat este contraindicată (persoanele imunodeficitare sau imunosupresate). Vaccinarea ADN are ca rezultat prezentarea epitopilor antigenici în asociație cu moleculele CMH I.

Vaccinarea cu ADN pare să fie sigură, prepararea este rapidă și vaccinul nu este influențat de factorul termic.

Vaccinuri obținute în plante. Plantele au fost folosite cu succes pentru a exprima gene străine și produse genice specifice. Utilitatea plantelor recombinate pentru producerea antigenelor vaccinale s-a demonstrat pentru tutun și tuberculii de cartof. În tuberculii de cartof s-au exprimat câteva Ag proteice: subunitatea B a toxinei TL de *E. coli*, Ag HBs, de rotavirus.

Nivelul expresiei proteinei la planta recombinată este adeseori scăzut, dar abordarea oferă o nouă strategie: vaccinarea este transferată funcției biologice de hrănire, care poate induce răspunsul imun al mucoaselor sau răspunsul sistemic.

Administrare. Vaccinurile virale inactivae și anatoxinele se administrează, în general, pe cale *parenterală* (subcutan, intradermic, intramuscular), în mod obișnuit în trei injecții separate la intervale de 5, 7 și respectiv 21 de zile.

Vaccinurile bacteriene vii și cele virale atenuate se administrează într-o singură doză, în general, pe cale parenterală. Vaccinul BCG, ca și vaccinul polio infecțios atenuat, la nou născuți se administrează pe cale orală.

Formularea vaccinului necesită încorporarea unui adjuvant pentru creșterea imunogenității. Adjuvanții optimizează eliberarea Ag și prezentarea, stimulează maturarea CD și induce sinteza citokinelor imunomodulatoare.

Imunitatea consecutivă vaccinării se instalează relativ lent, la circa 15–20 de zile de la ultima injecție și are o durată variabilă de la un vaccin la altul (în general, între 1 și 7 ani), scăzând treptat până la dispariția completă. Vaccinarea primară, ca și infecția, conferă organismului o stare specială de reactivitate imunitară – *memoria imunitară* – grație căreia, orice contact ulterior cu agentul patogen respectiv, realizat pe cale naturală (infecție și boală) sau pe cale artificială (prin vaccinare) declanșează o "redeșteptare" rapidă a imunității, care se manifestă cu o intensitate mai mare decât aceea a răspunsului imun postvaccinal. Cea de a II-a administrare a vaccinului declanșează o reacție anamnestică (de memorie), cu o creștere bruscă și masivă a titrului anticorpilor.

Deși în general este solidă, imunitatea postvaccinală este relativă, în sensul că unele persoane vaccinate pot totuși să facă infecția clinică într-o formă mai ușoară, mai ales consecutiv unei infecții masive cu un agent patogen deosebit de virulent.

Datorită faptului că se instalează lent, imunizarea prin vaccinare se folosește în scop profilactic pentru a evita riscul infecției cu un agent patogen.

Bibliografie

Murphy B. R., Chanock R. M. 1991. Immunization Against Viruses, în vol., Fundamental Virology, Second Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Murphy B. R., Chanock R. M 1996. Immunization Against Virus Disease, în vol. Fields Virology, third Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et. al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Bannister B., Begg N. T. 1990. Virus vaccines and antisera, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Ada G. 1998. Vaccines, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Mak T. K., Saunders M.E. 2006. Vaccines and Clinical Immunization, în vol. The Immune Response. Basic and Clinical Principles Elsevier Academic Press.

Zinkernagel R.M. 2003. On Natural and Artificial Vaccination – Annu. Rev. Immunol. 21, 515–546.

Donnelly J. J., Ulmer J. B., Shiver J. W., Liu M. A. 1997. DNA Vaccines. Annu. Rev. Immunol. 15: 617–648.

Air G. M., West J. T. 2008. Antigenic Variation, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W.

26. METODE DE STUDIU ŞI DE DIAGNOSTIC VIROLOGIC

Diagnosticul infecţiilor virale trebuie să fie rapid şi să identifice noile virusuri, multe necultivabile sau greu cultivabile.

Metodele de studiu şi de diagnostic sunt *directe* şi *indirecte*.

26.1. Metode directe

1. Examenul la microscopul electronic: *metoda coloraţiei negative, microscopia electronică în transmisie, imuno-electrono-microscopia*, pentru studiul morfologiei virale şi al etapelor ciclului de multiplicare.

2. Examenul histo-citologic la microscopul optic: observarea efectului citopatic (liză celulară, vacuolizare, sincitii, incluzii).

3. Izolarea virusului în culturi de celule, în oul embrionat de găină sau prin inocularea animalelor de laborator.

26.1.1. Metode microscopice

Microscopia electronică (ME) este singura metodă directă de studiu care vizualizează virusurile şi antigenele virale. Metoda este folosită pentru diagnosticul gastroenteritei virale, ai cărei agenţi etiologici se multiplică lent sau nu se multiplică *in vitro*, pentru analiza leziunilor tegumentare produse de virusurile herpetice, pox şi papiloma şi pentru studiul virusurilor care produc focare epidemice. Metoda a avut succes, în special pentru examinarea materiilor fecale, a leziunilor tegumentare, a concentratelor de urină, în care s-au evidenţiat virusuri care se cultivă cu dificultate: rota-, astro- şi alte virusuri mici sferice. Se poate folosi, de asemenea, pentru identificarea virusurilor izolate în cultură.

Pentru examinarea preparatelor la ME se folosesc două metode:

– *metoda coloraţiei negative*: suspensia virală se adsoarbe pe grilă de Cu şi se colorează cu un colorant electrono-dens (acid fosfotungstic sau acetat de uranil). Colorantul colorează fondul grilei, dar nu pătrunde în particulele virale intacte, care se pot astfel observa prin colorare negativă;

– examinarea *secţiunilor* tisulare sau a depozitului celular la microscopul electronic cu transmisie (TEM). Celulele sau ţesutul se fixează cu glutaraldehidă, se colorează cu tetraoxid de osmiu şi se includ în răşină Epoxy. Secţiunile ultrafine obţinute la microtom se examinează la TEM. Metoda are avantajul că detectează infecţii mixte (comune în celulele epiteliului intestinal), oferă un diagnostic rapid pentru pentru gastroenterita cu rotavirusuri şi pentru infecţiile herpetice ale tegumentului.

Dezavantaje: metoda este laborioasă şi nu permite prepararea unui număr mare de probe pentru ME; frecvent apar artefacte şi necesită expertiză pentru interpretarea imaginilor; este mai puţin sensibilă decât testele serologice pentru evidenţierea antigenelor virale sau decât metoda izolării virusului. Pentru detectarea virusului prin metoda ME sunt necesare 10^3–10^6 particule virale/ml.

Sensibilitatea metodei creşte prin centrifugarea suspensiei virale pe grilele de Cu, prin concentrarea virusului prin metoda ultrafiltrării* sau prin metoda imuno-electrono-microscopiei (IEM). În metoda IEM, grila de Cu se tapetează cu anticorpi specifici antivirali, cu rolul de a concentra virusul pe grilă.

* Ultrafiltrarea este o metodă ce utilizează membrane semipermeabile pentru separarea materialelor dizolvate şi suspendate pe baza dimensiunilor. Procesul se desfăşoară sub acţiunea presiunii negative care se aplică probei. Metoda se foloseşte pentru separarea macromoleculelor (proteine, polizaharide, lipide, polimeri sintetici) cu dimensiuni mai mici decât dimensiunile porilor membranei, virusurilor, coloizilor sau pentru concentrarea probelor diluate de acizi nucleici (1–10 nm).

Membranele au pori cu diametrul cuprins între 0,01–10 μm. Ultrafiltrarea nu discriminează între macromoleculele cu dimensiuni asemănătoare şi nu se foloseşte pentru separarea moleculelor care diferă cu mai puţin de un factor de 6. Pentru separarea unor astfel de molecule se folosesc tehnicile de cromatografie sau de electroforeză.

Metode histo-citologice. Examenul microscopic direct al probelor colorate histologic sau citologic poate să ofere indiciul că procesul patologic este determinat de un virus: de exemplu, incluziile nucleare evidenţiate în biopsiile de rinichi transplantat de la pacienţii cu nefrită interstiţială se datorează virusului polioma BK; schimbările citologice ale epiteliului cervixului uterin asociate infecţiei cu HPV; incluziile nucleare în celulele precursoare eritroide infectate cu parvovirusul B_{19}.

26.1.2. Metode de cultivare a virusurilor

Izolarea virusurilor prin cultivare a stat la baza progresului în virologia clinică.

Condiţii de recoltare şi transport al probelor. Unele virusuri sunt labile, fiind inactivate în câteva ore. Probele trebuie păstrate în mediu tamponat şi transportate la laborator în cel mai scurt timp, preferabil în aceiaşi zi. Pentru perioade mai lungi, probele trebuie să fie păstrate la 4°. Mediul de transport este mediul pentru culturile celulare, tamponat, cu adaus 5% ser fetal de viţel, antibiotice şi agenţi antifungici. Probele de urină pot fi plasate în mediu de transport cu 35% sorbitol.

Prezenţa virusului în probele clinice se poate demonstra prin inocularea *animalelor de laborator, a ouălor embrionate de găină* sau *în culturi de celule*.

Culturile de celule

O varietate de celule pot fi cultivate pe suportul solid de material plastic sau sticlă. Este cea mai folosită metodă pentru diagnosticul virologic.

Tipuri de culturi celulare. Cultura primară se obţine prin dispersia celulelor din ţesut, sub acţiunea enzimelor proteolitice (tripsina şi colagenaza). Culturile primare sunt diploide şi se folosesc pentru producerea vaccinurilor virale. Culturile de celule în monostrat se desprind cu enzime proteolitice şi cu agenţi chelatori (EDTA = versen) şi apoi se subcultivă în 2–3 recipiente. Durata de viaţă a celulelor diferenţiate este limitată şi variază în funcţie de tipul de celule şi de originea lor: celulele epiteliale umane pot fi subcultivate de circa 10 ori, iar fibroblastele de 40–60 de ori. Aceste culturi se numesc *linii celulare*.

Culturile celulare pot să derive din ţesuturile maligne, dar au complement cromosomal heteroploid. Astfel de culturi au o durată de viaţă nelimitată şi se numesc *linii celulare continui*. Liniile continui au pierdut inhibiţia de contact.

Inocularea probelor adecvate în linii celulare sensibile la virusul din probă, completată cu analiza microscopică a efectului citopatic (ECP), conferă metodei un grad superior de specificitate, care poate fi confirmat prin tehnica imunofluorescenţei.

Cele mai utilizate linii celulare sunt cele de rinichi de maimuţă, liniile celulare epiteliale umane în cultură continuă şi o linie de fibroblaste umane. Inocularea acestor linii permite detectarea majorităţii virusurilor cultivabile de importanţă clinică: HSV, VZV, CMV, enterovirusuri, virusul respirator sincitial (RSV), adenovirusuri, parainfluenza, influenza şi rhinovirusuri.

Cultivarea virusului dintr-o probă clinică aduce dovada prezenţei virusului infecţios, dar antigenele virale pot persista perioade lungi de timp, după iniţierea terapiei antivirale. De exemplu, antigenele HSV-2 se detectează în tampoanele genitale un interval relativ mare, după iniţierea terapiei, când virusul nu se mai izolează.

Metoda izolării virusurilor în cultură are câteva avantaje:

- oferă posibilitatea examinării ulterioare, cu privire la sensibilitatea la agenţii antivirali sau tipizare;
- oferă informaţii epidemiologice, importante pentru sănătatea publică;
- cultivarea oferă posibilitatea identificării unor virusuri noi (de exemplu, SARS).

Majoritatea virusurilor umane cunoscute pot fi izolate şi cultivate în culturi sau prin inocularea animalelor de laborator. Izolatele de HSV se multiplică în 3 zile pe fibroblastele umane, dar pentru cele mai multe izolate clinice timpul necesar exprimării ECP sau pentru hemadsorbţie este de 7–21 zile.

Metoda cultivării nu se aplică virusurilor gastroenteritei (rotavirusuri etc.), virusurilor hepatitice, EBV, HH6, 7 şi 8, HIV, VHB şi papiloma.

Coronavirusurile se multiplică puțin în culturi celulare și se pot izola în cultură de organe, deși metoda nu se folosește în mod obișnuit.

Perfecționarea continuă a tehnicilor de cultivare a celulelor a sporit numărul virusurilor care pot fi cultivate. Descoperirea IL-2, un factor stimulator al diviziunii limfocitelor, a ușurat cultivarea celulelor limfoide, ceea ce a dus la descoperirea retravirusurilor umane.

Izolarea virusurilor în cultură este metoda cu cea mai largă utilizare pentru diagnosticul virologic.

ECP. Modificările morfologice ale celulelor infectate se observă fără colorarea celulelor, dar pentru detalii suplimentare este necesară colorarea histochimică. Coloratia hematoxilină-eozină este cea mai adecvată.

Modificări produse de ECP :

- rotunjirea celulelor: multiplicarea virală induce modificări ale citoscheletului, care duc la rotunjire și eventual la liza celulei;
- formarea sincițiilor: membranele celulelor adiacente fuzionează și rezultă celule gigante cu câțiva nuclei (virusul rujeolei, VRS, HIV). Celulele sunt unite prin punți citoplasmatice (virusul herpes simplex);
- rotunjirea și agregarea celulelor în aglomerări ciorchine, care se detașează de suport (adenovirusuri);
- formarea incluziilor: incluziile sunt agregate nucleare sau citoplasmatice de componente ale multiplicării virale (fabrici de virus), ce se pot vedea pe preparatele colorate, la microscopul optic. Pot fi incluzii bazofile sau acidofile.

Pentru identificarea prezumtivă a izolatului, de obicei ECP este suficient. Tipul de celule în care se multiplică și produce ECP este un indiciu pentru identificarea virusului. De exemplu, HSV se multiplică în numeroase tipuri de celule, iar CMV, numai în culturi de fibroblaste umane. De aceea, pentru izolare este necesară inocularea probei în câteva tipuri de culturi celulare.

De obicei, culturile inoculate sunt cele primare de rinichi de maimuță, de rinichi uman sau fibroblaste de embrion uman. Culturile renale pot fi înlocuite cu o linie celulară continuă (HeLa, HEp-2).

Pentru izolarea virusurilor tractului respirator, culturile inoculate se incubează la 32° sau la 37°. Unele virusuri orthomyxo- și parainfluenza nu produc ECP evident, deși se multiplică intens. Multiplicarea lor se evidențiază prin *metoda hemadsorbției*: hematiile adăugate pe suprafața monostratului, aderă de celulele infectate. Aderența este mediată de spiculele de HA inserate în membrana citoplasmatică.

Inconvenientul major al izolării virusurilor în cultură de celule este durata multiplicării: virusurile se pot multiplica în 1–2 zile, dar CMV necesită circa 2 săptămâni, prea mult pentru utilizare clinică.

Alt inconvenient al metodei izolării virusurilor constă în faptul că succesul depinde de obținerea probei la momentul optim. Cu cât infecția este într-o fază mai timpurie, cu atât cantitatea de virus excretată este mai mare și șansa izolării virusului crește. Excreția virusului, în general, scade rapid după ce efectorii RI neutralizează virusul. Alteori (de exemplu, virusurile enterice și CMV), pot fi excretate perioade lungi – săptămâni sau luni – dar în aceste cazuri raportul etiologic cu maladia este greu de stabilit.

Pacienții imunocompromiși și copiii infectați congenital elimină virusul pentru perioade lungi sau eliminarea devine cronică: de exemplu, o mare proporție a acestor copii excretă CMV sau virusul rubeolei în urină, prin secreția faringiană sau pe ambele căi, pentru un an. Virusul rubeolei poate fi izolat câțiva ani după naștere din cataracte sau din urechea internă a copiilor infectați congenital.

Rolul culturilor celulare convenționale pentru diagnosticul de rutină al infecțiilor virale diminuează, deoarece multe laboratoare preferă diagnosticul prin detectarea antigenului viral cu anticorpi specifici marcați cu fluorocromi sau prin detectarea genomului virusurilor de importanță clinică (CMV, VZV).

S-au elaborat metode pentru detectarea celulelor infectate cu virus, înainte ca ECP să devină aparent. Metodologia utilizării AMC marcați cu fluorocromi combină specificitatea cu posibilitatea detectării timpurii a Ag virale. AMC sunt reactivi cu specificitate înaltă și au avantajul că pot fi folosiți pentru evidențierea antigenelor specific-virale. AMC au fost utilizați pentru diagnosticul infecției cu

CMV. CMV produce ECP vizibil după 7–10 zile, dar Ag virale imediat- timpurii (IE) şi timpurii (E) pot fi detectate în celulele infectate în 3–6 ore după infecţie, cu mult înainte de producerea ECP.

Embrionul de găină de 8–11 zile este inoculat şi incubat pentru 2–9 zile, durata variind în funcţie de virus, de calea de inoculare. Virusurile se identifică prin leziunile pustulare ale membranei corioalantoice, iar pentru testele de hemaglutinare (HA) se foloseşte lichidul amniotic sau alantoic.

Multe virusuri se cultivă în oul embrionat, dar metoda este rareori folosită: pentru evidenţierea poxvirusurilor şi pentru propagarea ortho- şi paramixovirusurilor.

Inocularea animalelor de laborator se foloseşte numai pentru arbo- şi coxsackievirusuri. Unele coxsackievirusuri de grup A se multiplică greu în cultură de celule, dar se multiplică prin inocularea intracerebrală la puii nou născuţi de şoarece. Tipul de paralizie poate fi folosit pentru identificarea grupului de coxsackievirusuri.

26.2. Metode indirecte

1. Metode *imunologice*: detectarea antigenelor virale (utilizând AMC) sau a anticorpilor specifici (virusurile sunt imunogene şi stimulează RI intens) printr-o metodă adecvată.

2. Metode *moleculare* pentru detectarea genomului viral:

– *reacţia de polimerizare în lanţ* (*Polymerase Chain Reaction* – PCR);

– *hibridizarea cu sonde moleculare* specifice pentru o secvenţă ţintă unică, pe preparate citologice/histologice.

26.2.1. Metode imunologice (serologice)

Metodele imunologice sunt folosite în virologie, cu câteva scopuri:

– pentru a identifica un virus izolat, utilizând un ser imun cu specificitate cunoscută;

– pentru demonstrarea Ag virale într-o suspensie sau în celule;

– pentru diagnosticul serologic al infecţiei virale;

– pentru testarea capacităţii imunogene a unui virus.

Proteinele structurale virale, ca şi cele sintetizate în celula infectată sunt foarte imunogene şi stimulează sinteza anticorpilor. În cursul răspunsului imun primar se sintetizează predominant IgM.

26.2.1.1. Evidenţierea anticorpilor

Toate infecţiile virale sunt însoţite de sinteza Ac, a căror evidenţiere în infecţia primară (IgM) şi în convalescenţă se face prin următoarele metode:

– reacţia de fixare a complementului (RFC);

– hemaglutinoinhibarea;

– imunofluorescenţa;

– testul IPI (imunoperoxidazei indirecte);

– seroneutralizarea;

– contra-imunoelectroforeza (CIEF);

– EIA (Enzyme linked immunosorbent assay);

– latex-aglutinarea;

– western blot (WB);

– RIA.

Determinarea IgM specific. IgM este produs timpuriu în răspunsul imun şi persistă 3–4 luni, iar IgG persistă tot restul vieţii. Detectarea IgM este dovada directă a infecţiei recente cu un anumit virus. Testele de primă generaţie ale determinării IgM au fost laborioase pentru că necesită separarea fizică a IgM de celelalte izotipuri. Având gr. mol. mai mare, IgM se poate separa de IgG prin gel-filtrare sau prin centrifugare în gradient de densitate de sucroză. Fracţiile care conţin IgM se colectează şi se testează pentru prezenţa Ac specifici antivirali, prin metodele IFA sau HAI.

Anticorpii specifici clasei IgM pot fi detectaţi prin teste imunologice, fără fracţionare prealabilă, folosind Ac anti-IgM. Anticorpii anti-IgM sunt imobilizaţi pe o suprafaţă solidă şi se pun în

contact cu serul. IgM seric este captat pe suportul solid. Metoda este mai sensibilă şi mai simplă, deoarece elimină etapa fracţionării.

Toate metodele de separare a IgM, dar mai ales metoda captării pe suportul solid, nu fac distincţia între IgM şi FR (IgM anti-Ig). FR se găseşte în serul unui procent mare de persoane adulte şi la toţi cei cu infecţii acute sau cronice. De aceea, FR se adsoarbe cu IgG agregat, pentru că altfel, rezultatele determinării IgM vor fi fals pozitive.

Alte tehnici serologice: hemaglutino-inhibarea (HAI), latex-aglutinarea şi IF (în special pentru diagnosticul (EBV). Serul este proba pentru cele mai multe metode serologice, dar secreţia salivară se poate folosi pentru detectarea Ac, în special în studiile de monitorizare la copii. De la pacienţii cu infecţii ale SNC, se poate testa lichidul cefalorahidian (LCR) pentru prezenţa Ac antivirali, iar raportul titrului Ac faţă de titrul seric oferă indicii cu privire la situsul sintezei Ac.

Pentru diagnosticul imunologic sunt necesare 2 probe de ser: una recoltată în faza acută (înainte de ziua a 7-a după infecţie) şi o probă recoltată în convalescenţă (recoltată la 1–2 săptămâni după faza acută). Cele 2 probe se testează concomitent. Creşterea de cel puţin 4 ori a titrului de Ac arată că infecţia s-a produs cu acel virus.

Metodele imunologice sunt esenţiale pentru diagnosticul şi monitorizarea acţiunii tratamentului asupra evoluţiei infecţiilor persistente: anticorpii se detectează în infecţiile persistente în condiţiile multiplicării virale (VHB, HIV, VHC).

Metodele serologice au o valoare limitată în diagnosticul infecţiilor virale la pacienţii imunocompromişi, unde virusul trebuie identificat.

Uneori Ac sunt neutralizanţi (poliovirus). Multe infecţii sunt controlate mai eficient de celulele T, iar detectarea Ac este o metodă cu importanţă secundară.

Metodele de determinare a Ac nu disting între IgG şi IgM. Diagnosticul unor infecţii virale se bazează pe seroconversie, adică pe creşterea semnificativă a titrului Ac între proba din faza acută şi cea din convalescenţă (la interval de 10–14 zile). RFC a fost folosită pe scară largă, dar lipsa de sensibilitate şi reactivitatea încrucişată a multor Ag utilizate în test a limitat utilizarea metodei în laboratorul clinic.

Diagnosticul se poate pune numai după faza acută a infecţiei.

Pentru primele 2 obiective (identificarea unui virus izolat şi demonstrarea antigenelor virale în suspensie sau în celule), se foloseşte serul specific standard. Pentru obiectivele 3 şi 4 (diagnosticul serologic şi testarea capacităţii imunogene a unui virus), probele de ser de la pacienţi se testează pentru prezenţa Ac, folosind Ag virale cunoscute.

Testele de *neutralizare* măsoară titrul de Ac care neutralizează infecţiozitatea virusului. Testul constă în diluarea serului şi incubarea diluţiilor cu o doză fixă de virus (de obicei 50% doze infecţioase) pentru 1 oră la 37° sau peste noapte la 4°. Amestecul este inoculat în culturi sensibile. Diluţia de ser care inhibă multiplicarea virusului în 50% din culturi este considerată ca fiind titrul neutralizant.

Evidenţierea antigenelor virale. Antigenele virale în suspensie (sânge, urină, fecale, suspensii tisulare) se pot demonstra prin testul imuno-enzimatic (EIA), testul latex-aglutinării sau RIA. În aceste teste, Ac specifici sunt adsorbiţi pe un suport solid (granule de plastic, godeuri, particule de latex) şi au rolul de a lega Ag din probă. Ag legat se detectează adăugând un Ac specific marcat cu o enzimă sau cu un izotop.

Metoda *latex-aglutinării pentru detectarea Ag* în fază solidă se foloseşte pe scară largă. Particulele mici de latex tapetate cu Ac specifici aglutinează în prezenţa Ag. Reacţia se observă cu ochiul liber. Metoda latex aglutinării se foloseşte pentru diagnosticul infecţiei cu rotavirusuri.

Metodele ELISA, EIA.

Principiu. Anticorpul indicator sau Ag este conjugat cu o enzimă. Prezenţa lor se detectează prin adăugarea unui substrat care este convertit la un produs colorat, sub acţiunea enzimei. Reacţia de culoare poate fi înregistrată vizual sau se măsoară spectrofotometric. Enzimele cele mai folosite sunt peroxidaza şi fosfataza alcalină, care utilizează substraturi incolore.

Metoda este larg utilizată pentru detectarea Ag de suprafaţă a HBV şi mai recent pentru detectarea proteinei C (a regiunii centrale) a virusului hepatitei C (VHC) în laboratorul de analiză a donorilor de sânge.

ELISA în faza solidă se foloseşte pe scară tot mai mare în laboratorul de diagnostic. Se folosesc Ag peptidice sintetice sau Ag recombinante, în locul lizatului viral brut. Formatul testului ELISA este foarte versatil. În esenţă, sunt comercializate 3 tipuri de teste automatizate:

1) Testul indirect: antigenul viral este imobilizat pe fază solidă. Anticorpii din ser se leagă cu antigenul şi după spălare, anticorpii sunt detectaţi cu Ig antiumană marcată. Se detectează IgG şi IgM în funcţie de Ig indicatoare. Dacă proba este pozitivă pentru FR, rezultatul poate fi fals pozitiv pentru IgM.

2) Captarea anticorpilor: Ig antiumană este fixată pe faza solidă, cu rolul de a capta IgG sau IgM din probă. Se adaugă antigenul, iar în final anticorpul marcat.

3) Testul competiţiei antigenelor: în sistemul ELISA, Ag este imobilizat, iar un Ac marcat intră în competiţie pentru legarea Ag, cu anticorpii din proba clinică.

Diagnosticul serologic al infecţiei acute (fig. 453) este indicat în cazul în care detectarea virusului este dificilă, necesită prea mult timp sau în cazurile în care asamblarea virusului a încetat (virusul hepatitei A, virusul rubeolei sau parvovirusul B_{19}).

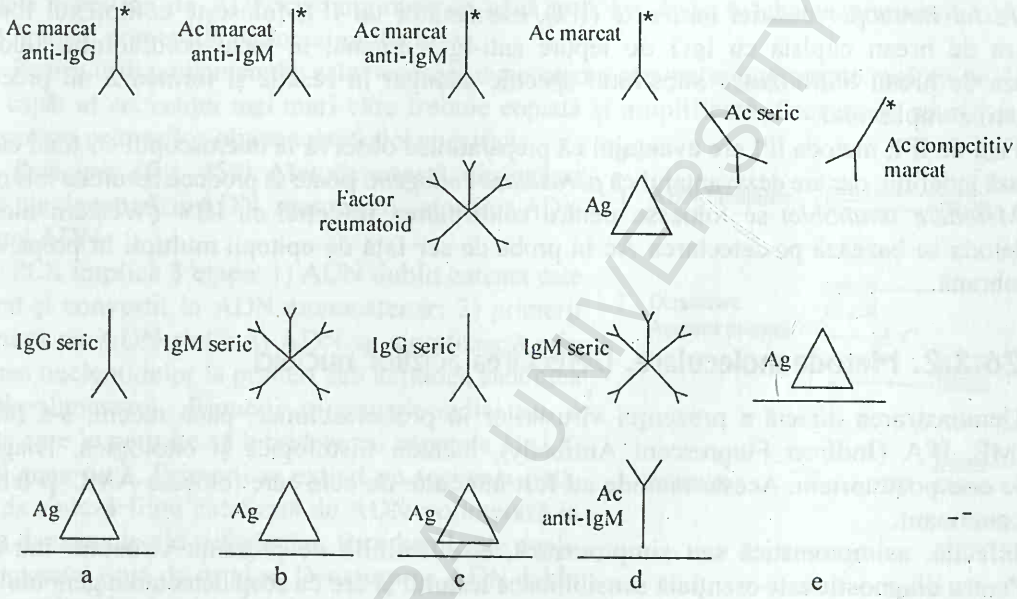


Fig. 453. Ilustrarea schematică a variantelor serologice de diagnostic viral. a. Testul indirect al detectării IgG în varianta EIA. b. Testul indirect al detectării IgM. c. Interferenţa FR în testul indirect al IgM. d. Testul captării IgM seric cu anticorpi anti-IgM. e. Testul legării competitive a Ac serici şi a Ac marcaţi. Liniile din partea de jos a schemei reprezintă suportul solid de care se leagă unul dintre reactanţi (după K. Jeffery and Emma Aarons, 2004).

Tehnicile care utilizează anticorpi marcaţi sunt imunofluorescenţa (IFA = Ac imunofluorescenţi) şi *imunoperoxidazei indirecte* (IPI), care utilizează Ac marcaţi cu peroxidază. Utilizarea IPI este uşurată de faptul că substraturile enzimei sunt etil-carbazolul şi 5-cloronaftolul, care precipită la situsul enzimei, crescând sensibilitatea metodei. Avantajul IPI este că preparatul este permanent. Pentru creşterea sensibilităţii, poate fi adăugat marcajul cu biotină, care apoi se leagă cu avidina, conjugată cu peroxidaza.

Probele (raclaj, frotiu, secţiuni fine, aspirat) pentru demonstrarea directă a antigenelor virale prin metodele IFA sau IPA se depun pe lamă de microscop şi se fixează cu acetonă rece. Virusul sau antigenul viral se detectează cu Ac marcaţi (monoclonali sau policlonali). De cele mai multe ori, Ac sunt nemarcaţi şi se detectează cu al II-lea Ac marcat (metoda indirectă) anti-catenă H.

26.1.2.2. Evidenţierea antigenelor

Detectarea antigenului prin metoda IF este o variantă rapidă de diagnostic. Iniţial s-au folosit seruri policlonale, iar ulterior AMC.

Metoda directă foloseşte ca indicator, Ac marcat, iar cea indirectă, un Ac anti-specie marcat, pentru a evidenţia Ag viral. Markerul este fluoresceina.

Metoda IF indirecte (IFI) este mai sensibilă, deoarece pe celula infectată se fixează o cantitate mai mare de marker. Rezultatele pot fi disponibile în 1–2 ore după primirea probei. Metoda se foloseşte pentru diagnosticul infecţiilor tractului respirator (cu VRS, cu parainfluenza, cu influenza A şi B), pielii, ochiului şi creierului (herpesvirusuri, adenovirusuri) şi oferă un diagnostic rapid, în câteva ore, dacă frotiul cu celule infectate se obţine repede (spălătură bronşică, sediment urinar, raclaj tegumentar sau material din biopsie). Este mai sensibilă comparativ cu metoda ME sau cu metoda inoculării în cultura de celule, în special pentru detectarea VRS. Proba ideală este aspiratul nazofaringian de la copiii cu bronşiolită, pentru care rezultatul rapid este esenţial, iar antigenele virusurilor respiratorii se exprimă pe celulele epiteliale.

Metoda IF directe permite detectarea semi-cantitativă a celulelor sanguine infectate cu CMV. Tehnica presupune separarea leucocitelor mononucleare din sânge, fixarea pe lamă şi colorarea cu AMC anti-proteina matriceală pp65 umană. Frecvenţa celulelor pozitive este indiciul infecţiei cu CMV la pacienţii imunocompromişi. Metoda este laborioasă şi necesită prelucrarea rapidă a probelor. Din aceste motive, antigenemia se determină prin metoda PCR.

Testul imunoperoxidazei indirecte (IPI), asemănător cu IFI, foloseşte complexul format din peroxidaza de hrean cuplată cu IgG de iepure anti-IgG umană, în locul colorantului fluorescent. Peroxidaza de hrean hidrolizează substratul specific adăugat în reacţie şi formează un precipitat la locul legării complexului.

Faţă de IFI, metoda IPI are avantajul că preparatul se observă la microscopul cu fond clar, lama se păstrează indefinit, dar are dezavantajul că *peroxidaza endogenă* poate să producă rezultate fals pozitive.

Metodele imunoblot se folosesc pentru confirmarea infecţiei cu HIV (Western blot) şi cu HCV. Metoda se bazează pe detectarea Ac în proba de ser faţă de epitopii multipli în preparatul blot pe o membrană.

26.2.2. Metode moleculare. Detectarea acizilor nucleici

Demonstrarea directă a prezenţei virusurilor în probele clinice, până recent, s-a făcut prin metoda ME, IFA (Indirect Fluorescent Antibody), metoda histologică şi citologică. Diagnosticul histologic este postmortem. Aceste metode au fost înlocuite de cele care folosesc AMC şi tehnologia ADN recombinant.

Infecţia, asimptomatică sau simptomatică, este definită de prezenţa virusului într-o probă clinică. Pentru diagnostic este esenţială sensibilitatea testului şi are ca scop detectarea genomului viral. Un test calitativ sensibil este relevant pentru diagnosticul HIV la copii, sub forma ADN proviral în leucocitele periferice sau al infecţiei cu HCV, sub forma ARN seric.

Diagnosticul rapid al infecţiilor virale se realizează prin metodele care utilizează ADN recombinant şi de amplificare moleculară, care oferă rezultate calitative şi cantitative, cu o sensibilitate superioară celorlalte metode.

Tehnicile ADN recombinant permit demonstrarea acidului nucleic viral în probele analizate, ca o alternativă la detectarea Ag virale. Tehnica este adecvată virusurilor al căror genom se integrează în ADN celular sau persistă sub forma genomului viral episomal. Expresia genelor papiloma este foarte limitată şi infecţia nu poate fi diagnosticată prin metodele de detectare a Ag. ADN viral se evidenţiază prin hibridizarea dot-blot sau hibridizare *in situ*.

Principiu. Metoda hibridizării *dot-blot* şi *in situ* se bazează pe principiul conform căruia AN monocatenar se va renatura cu catenele complementare obţinute prin tehnologia ADN recombinant.

În metoda *hibridizării dot-blot*, AN este extras din celule (ţesut) şi imobilizat pe filtru de nitroceluloză sau nylon. ADN este foarte stabil şi rezistent la tratamente dure cu 0,3 M NaOH la 60°, folosite pentru eliberarea ADN de proteine, de ARN şi de membranele celulare, în probele clinice. Se adaugă proba, selectată pentru o regiune specifică a AN viral, care se va alinia cu catenele complementare, timp de circa 6 ore. Proba poate fi marcată cu un radioizotop, cu biotină sau cu coloranţi fluorescenţi (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole), care se colorează albastru sau cu acetyl aminofluorene (AAF), ce se colorează roşu la lumina uv. Legarea probei marcate de AN se evidenţiază ca o pată neagră pe membrană. Metoda detectează până la circa 10.000 copii de AN viral.

Hibridizarea *in situ* se foloseşte pentru evidenţierea AN viral, direct în secţiunea tisulară.

Până acum, metoda a fost folosită în special pentru virusurile cu genom ADN. ARN este denaturat prin metodele de extracţie şi este mai sensibil la atacul nucleazei decât ADN. Tehnica se foloseşte pentru diagnosticarea infecţiilor cu HPV, ce nu pot fi cultivate, iar expresia Ag în ţesutul infectat este foarte limitată şi pentru diagnosticul infecţiilor cu herpesvirusuri, mult mai rapidă decât metoda izolării în cultura de celule.

Metoda hibridizării AN nu este la fel de sensibilă ca metoda detectării Ag, deoarece în ciclul multiplicării se sintetizează mai puţine molecule de AN decât proteine. Acest neajuns a fost eliminat prin metoda PCR. Avantajul major al metodei este că Taq ADN-polimeraza izolată din bacteria *Thermus aquaticus* este rezistentă la temperatură, ceea ce permite succesiunea ciclurilor de denaturare a ADN şi alungirea primerilor, ceea ce produce o amplificare de până la 1 million de ori a segmentelor de ADN. PCR poate să detecteze un singur genom viral într-o suspensie celulară sau în secţiune tisulară.

PCR (Reacţia de polimerizare în lanţ) este o metodă simplă şi rapidă de a copia şi a amplifica secvenţele specifice de ADN cu lungimea de până la 1 kb. Este o tehnică preparativă şi analitică folosită în toate domeniile biologiei moleculare.

Pentru utilizarea metodei este necesară cunoaşterea secvenţei unei scurte regiuni de ADN de la fiecare capăt al secvenţei mai mari care trebuie copiată şi amplificată. Secvenţele scurte se folosesc pentru sinteza primerilor oligonucleotidici specifici.

Principiu (fig. 454). Metoda constă din cicluri repetate ale denaturării ADN, reasocierii catenelor ADN şi sintezei ADN.

PCR implică 3 etape: 1) ADN dublu catenar este denaturat şi convertit la ADN monocatenar; 2) primerii se asociază cu ADN ţintă; 3) ADN se sintetizează prin adăugarea nucleotidelor la primeri sub acţiunea catalitică a ADN-polimerazei. Primerii oligonucleotidici au o secvenţă care le permite să hibrideze cu capetele 3' şi 5' ale unei gene ţintă. Primerii se extind pe secvenţa ţintă, reacţia de sinteză-fiind catalizată de ADN-polimerază în prezenţa deoxinucleotid-trifosfaţilor. Rezultatul este duplicarea secvenţei ţintă de origine. Denaturarea ADN dublu catenar rezultat după primul ciclu şi repetarea procesului de multe ori produc creşterea exponenţială a cantităţii de ADN ţintă.

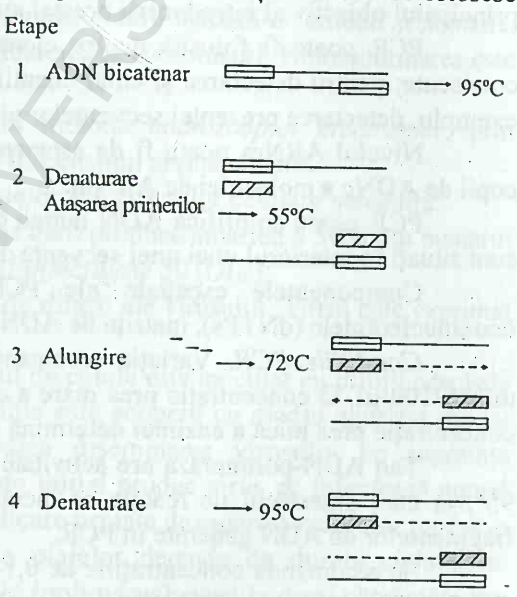


Fig. 454. Ilustrarea schematică a principiului şi etapelor tehnicii PCR (după K. Jeffery and Emma Aarons, 2004).

ADN dublu catenar care conţine secvenţa ce urmează a fi copiată şi amplificată, se amestecă cu un mare exces molar a două oligonucleotide de ADN monocatenare – *primerii*.

Primul primer este identic cu secvenţa capătului 5' al catenei sens al ADN ce va fi copiat, iar al II-lea primer este identic cu secvenţa de la capătul 3' al catenei opuse. Pentru că ADN dc este antiparalel, al II-lea primer este complementul inversat al catenei sens.

Reacţia de polimerizare în lanţ este iniţiată prin denaturarea ("topirea") ADN la temperatură înaltă şi răcirea amestecului pentru a permite reasocierea şi formarea dublei catene. În timpul reasocierii, primul primer, prezent în mare exces molar, va hibrida la capătul 5' al catenei sens, iar al II-lea primer, de asemenea prezent în mare exces molar, va hibrida cu capătul 3' al catenei antisens.

Amestecul reasociat pe baza complementarităţii bazelor se incubează cu ADN polimeraza I şi cu toate cele 4 deoxinucleotid-trifosfaţi (A, T, G şi C). Se sintetizează ADN nou: ADN polimeraza I va extinde capătul 3' al fiecărui primer legat şi se sintetizează complementul matriţei de ADN monocatenar.

Catena sens originală are rolul de matriţă pentru sinteza unei noi catene antisens, iar catena antisens originală are rolul de matriţă pentru sinteza unei noi catene sens. Cu aceasta se încheie ciclul I al reacţiei de polimerizare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ciclul II al reacției este inițiat după ce amestecul de reacție este denaturat din nou și catenele, atât cele originale, cât și cele sintetizate în ciclul I, se aliniază cu primerii. În treapta de sinteză a ADN din ciclul II, fiecare lanț sintetizat în primul ciclu, dar și catenele originale au rol de matriță după ce au hibridat cu primerii adecvați. Numărul matrițelor în reacție se dublează la fiecare ciclu și de aici derivă numele de "reacție în lanț".

Ciclul al II-lea al reacției se încheie când ADN-polimeraza I extinde primerii și sintetizează catene complementare matrițelor.

Reacția de polimerizare poate fi condusă pentru 20 sau un număr mai mare de cicluri.

Teoretic, fiecare rund de replicare dublează numărul moleculelor de ADN, dar procesul rareori are eficiență de 100% datorită prezenței inhibitorilor ADN-polimerazei, care în rundurile ulterioare limitează randamentul reacției.

Reacțiile sunt automatizate, folosind termocicluri cu temperatură controlată pentru reglarea denaturării, reasocierii și sintezei ADN. Se utilizează Taq-polimeraza (o ADN polimerază I) care suportă temperatura de denaturare a ADN, izolată de la bacteriile termofile.

Reacția de polimerizare în lanț are multe utilizări. De exemplu, folosind primerii adecvați poate fi amplificată orice secvență de ADN. După amplificare, ADN poate fi legat într-un vector adecvat și astfel secvența ADN se determină fără să necesite izolarea genei ADN. Acesta a fost principalul obiectiv al introducerii acestei metode.

PCR poate fi folosită pentru clonarea genelor cunoscute sau a genelor înrudite cu genele cunoscute; pentru detectarea și chiar cuantificarea unei secvențe particulare de ADN într-o probă (de exemplu, detectarea prezenței secvențelor virale într-o probă clinică).

Nivelul ARNm poate fi de asemenea cuantificat după transcrierea inversă și obținerea unei copii de ADNc a moleculei de ARNm.

PCR poate amplifica ADN numai când cei doi primeri sunt apropiați unul de celălalt (adică sunt situați în interiorul unei unei secvențe de 1 kb).

Componentele esențiale ale PCR sunt: Taq ADN-polimeraza, primerii oligomerici, deoxinucleotidele (dNTPs), matrița de ADN și ionii de Mg.

Condițiile PCR. Variația recomandată a concentrației Taq ADN-polimerazei este 1,0–2,5 unități/100 µl. O concentrație prea mare a enzimei favorizează formarea produselor nespecifice, iar o concentrație prea mică a enzimei determină formarea unei cantități insuficiente de produs.

Taq ADN-polimeraza are activitate optimă la 70° și nu este inactivată la temperatura de 90–95°, la care amestecul de reacție se incubează pentru scurte intervale de timp pentru denaturarea fragmentelor de ADN generate în PCR.

Se recomandă concentrațiile de 0,1–0,5 µM ale primerilor. Concentrațiile mai mari de primer pot favoriza formarea produselor nespecifice și în special pot crește rata asocierii primer-dimer. Produsele nespecifice și artefactele primer-dimer sunt substraturi pentru PCR și rezultatul este scăderea cantității de produs specific.

Primerii tipici au o lungime de 18–28 nucleotide, cu o proporție de G + C de 50–60%. Primerii trebuie să aibă temperaturi asemănătoare de denaturare (Tm).

Concentrațiile dNTP care dau specificiate și fidelitate optimă sunt de 20–200 µM, iar a ionilor de Mg, de 0,5–2,5 mM.

PCR presupune un ciclu repetitiv între o temperatură înaltă necesară denaturării ADN, o temperatură relativ scăzută pentru a permite primerilor să se hibrideze cu regiunea complementară a ADN și o temperatură intermediară pentru extensia primerilor. Reglarea temperaturii și durata de timp a fiecărui interval depind de compoziția în baze, lungimea și concentrația primerilor. Temperatura de hibridare de 55–72° dă cele mai bune rezultate. La o concentrație de 0,2 µM, hibridarea necesită numai câteva secunde.

Activitatea enzimei variază cu două ordine de mărime între 20 și 85° C. Extensia primerilor are loc la 72°, optimă pentru Taq ADN-polimerază.

Condițiile tipice pentru denaturare sunt la 94–95°, pentru 30–60 secunde. Temperaturile inferioare pot da o denaturare incompletă a matriței și/sau a produsului de reacție. O denaturare la o

temperatură prea înaltă sau prelungită prea mult, duce la pierderea activității enzimei. Timpul de înjumătățire a activității Taq ADN-polimerazei este de 40 min. la 95°. Un număr prea mare de cicluri de reacție poate crește cantitatea și complexitatea produselor nespecifice, iar un număr prea mic de cicluri furnizează o cantitate prea mică de produs final.

Alegerea corectă a primerilor este foarte importantă. Trebuie cunoscută secvența genomului cel puțin a unei regiuni, iar primerii trebuie să țintească o regiune bine conservată.

Produsul reacției de amplificare are dimensiuni cunoscute și poate fi detectat pe gel de agaroză, în comparație cu o scară de greutăți moleculare cunoscute. În produsul de amplificare se poate evidenția mai mult decât o bandă sau banda nu are localizare corectă.

26.3. Cuantificarea multiplicării virale

Metode fizice. PCR (metodă bazată pe detectarea acizilor nucleici) poate să determine numărul copiilor genomice ale virionilor infecțioși și neinfecțioși într-o probă.

Testele *serologice* – RIA și ELISA – pot să determine cantitatea de virus dintr-o probă. Aceste metode nu disting între particulele infecțioase și neinfecțioase și uneori detectează proteinele virale neasamblate.

Unele virusuri posedă o proteină cu funcție *aglutinantă* pentru hematiile umane și animale. Testele de HA sunt metode ușoare și rapide pentru cuantificarea acestor virusuri. Hemaglutinarea este produsă de virionii infecțioși și neinfecțioși.

Numărul de virioni poate fi evaluat direct prin metoda *microscopiei electronice*, prin comparație cu o suspensie standard de particule de latex de dimensiuni asemănătoare.

Metodele biologice se bazează pe inocularea animalelor sau culturilor celulare sensibile:

- determinarea *dozei letale 50* (DL_{50}) (doza de virus care produce moartea a 50% din numărul total de animale infectate) sau determinarea *dozei infecțioase* 50 (DI_{50});
- determinarea *ECP* în culturi de celule la o serie de diluții ale virusului. Titrul este exprimat în DI_{50};
- metoda *plajelor* este cea mai folosită. Monostratul de celule este inoculat cu diluții adecvate de virus. După adsorbția virusului, stratul de celule este acoperit cu mediu agarizat sau cu carboxi-metilceluloză (CMC) pentru a împiedica diseminarea virusului pe suprafața monostratului. După câteva zile, celulele infectate inițial produc virus ce infectează numai celulele învecinate. Ciclurile succesive de multiplicare urmate de moartea celulelor produc o plajă de liză. Durata de timp până la apariția plajelor depinde de durata ciclului de multiplicare a virusului și variază de la câteva zile (poliovirus), până la două săptămâni sau mai mult (SV_{40}). În condiții controlate, o plajă de liză poate să rezulte prin multiplicarea unei singure particule virale, denumită *UFP*. Plajele pot fi numărate macroscopic. Raportul numărului de particule infecțioase față de numărul total de particule virale variază de la 1 la mai mult de 1/1000, cu o medie de 1/câteva sute;
- unele virusuri (herpes, vaccinia) formează *pustule* pe membrana corioalantoică a embrionului de găină. Ele pot fi cuantificate prin raportarea numărului de pustule calculat la diluția virusului inoculat.

26.4. Purificarea și identificarea virusurilor

În vederea purificării, virusul se cultivă într-un substrat celular permisiv sau se inoculează la gazde sensibile pentru obținerea unei cantități mari de virus.

Prima treaptă a purificării este *concentrarea* particulelor virale. Concentrarea se face prin metoda precipitării cu sulfat de amoniu, etanol sau PEG sau prin metoda ultrafiltrării.

Pentru concentrarea virusurilor hemaglutinante se folosește metoda *hemaglutinării*, urmată de *eluția* virusului.

Odată concentrat, virusul poate fi separat de materialele probei prin centrifugare diferențială, centrifugare în gradient de densitate, cromatografie în coloană și electroforeză.

Pentru o purificare adecvată este necesară mai mult decât o etapă. Purificarea preliminară are scopul de a îndepărta cel mai mult material neviral, prin centrifugare. Treapta finală include totdeauna centrifugarea în gradient de densitate.

Virusurile pot să fie purificate prin centrifugare la viteză înaltă în gradiente de densitate de clorură de cesiu, tartrat de potasiu, citrat de potasiu sau sucroză.

Cantități mici de material celular tind să se adsoarbă pe particulele virale și să co-purifice. Criteriul minim de puritate este aspectul omogen la microscopul electronic.

Identificarea unei particule ca virus se face pe baza următoarelor principii:

- particula poate fi obținută numai din celule sau din țesuturi infectate;
- particulele obținute din diferite surse sunt identice, indiferent de substratul în care se cultivă;
- inactivarea infecțiozității sub acțiunea factorilor fizici sau chimici este asociată cu pierderea activității virale;
- serul imun anti-virus infecțios reacționează cu particulele virale;
- pasajul particulelor în cultura celulară permisivă duce la producerea virusului progen.

26.5. Acțiunea factorilor fizici și chimici asupra virusurilor

Reacția la temperatură este foarte diferită: virusurile icozaedrice nude tind să fie stabile, pentru că pierd puțin din infecțiozitate după câteva ore la 37°. Virusurile învelite sunt mai temosensibile: titrul infecțios scade rapid la 37°.

Infecțiozitatea virală, în general, este anulată la 50–60° pentru 30 min. Excepțiile sunt VHB, poliomavirusurile.

Virusurile pot fi conservate la temperaturi sub-îngheț și unele suportă liofilizarea (înghețarea prin uscare) și pot fi păstrate în stare uscată la 4° sau la temperatura camerei. Virusurile care suportă liofilizarea sunt mai termorezistente, dacă sunt supuse încălzirii în stare uscată. Virusurile învelite pot să-și piardă infecțiozitatea după păstrare prelungită la –90° și sunt foarte sensibile la îngheț-dezgheț repetat.

Multe virusuri pot fi *stabilizate* cu săruri ($MgCl_2$, $MgSO_4$, Na_2SO_4), la concentrația de 100 moli/L și astfel își păstrează infecțiozitatea prin încălzire la 50° timp de o oră. Mecanismele prin care sărurile stabilizează preparatele virale, nu se cunosc, dar efectul este important pentru prepararea vaccinurilor.

Virusurile sunt stabile la pH cuprins între 5 și 9. Enterovirusurile sunt rezistente la condițiile acide. Toate virusurile își pierd infecțiozitatea în mediul alcalin.

Radiațiile uv, x și particulele cu energie înaltă inactivează virusurile. Doza inactivatoare variază la diferite virusuri.

Detergenții neionici (Nonidet, P_{40} și Triton x-100) solubilizează constituienții lipidici ai peplosului, iar proteinele sunt eliberate fără a fi denaturate. Detergenții anionici (SDS) solubilizează învelișul și sparg capsida în polipeptide distincte.

Formaldehida anulează infecțiozitatea virală, prin reacția cu acizii nucleici dar are efecte adverse minime asupra antigenității proteinelor. Virusurile cu genom monocatenar sunt inactivate mai ușor decât cele dublu catenare. De aceea, formaldehida a fost adeseori folosită pentru producerea vaccinului inactivat. Antibioticele și sulfonamidele nu acționează asupra virusurilor.

Compușii quaternari ai amoniului nu au activitate antivirală, ca și compușii organici cu iod. Concentrații mai mari de clor sunt necesare pentru inactivarea virusurilor, în special în prezența proteinelor străine. De exemplu, tratamentul cu clor al fecalelor pentru inactivarea bacililor tifici, este inadecvată pentru a inactiva virusul polio.

Inactivarea virusurilor se face în scopul sterilizării laboratorului și echipamentelor sau pentru dezinfectarea suprafețelor și a tegumentului, pentru dezinfectarea apei și pentru producerea vaccinului viral inactivat.

Sterilizarea se poate realiza cu vapori de apă sub presiune, cu căldură uscată, oxid de etilenă, iradiere gama. Suprafețele se dezinfectează cu hipoclorit de sodiu, glutaraldehidă, formaldehidă, acid

peracetic. Tegumentul se dezinfectează cu clorhexidină, etanol 70% şi iodofori. Pentru producerea vaccinurilor se foloseşte formaldehida, β-propiolactona, psoralenul asociat cu radiaţia uv sau cu detergenţi.

Bibliografie

Jeffery K., Pillay D. 2004. Diagnostic Approaches – în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, 2004, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Kangro H. O. 1990. The Diagnosis of Virus Infections, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity,8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

McIntosh K. 1990. Diagnostic Virology, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

27. CHIMIOTERAPIA INFECŢIILOR VIRALE

> If it were not for the great variability among individuals, medicine might as well be a science and not an art (sir William Osler, 1892).

Chimioterapia s-a impus ca metodă de tratament a infecţiilor virale care nu beneficiază de vaccin. Cei mai simpli agenţi infecţioşi sunt cel mai greu de controlat.

Condiţia majoră a unui compus antiviral este *selectivitatea*. Inhibitorii multiplicării virale nu trebuie să producă efecte toxice asupra celulelor, ţesuturilor şi organelor gazdei. Dificultatea majoră în calea găsirii unor agenţi antivirali, se datorează incapacităţii agenţilor chimici de a discrimina între mecanismele multiplicării virale şi procesele de biosinteză celulară. Discriminarea acestor procese nu este posibilă în totalitate, deoarece moleculele specific virale sunt sintetizate de aparatul celular: ribosomii şi enzimele sintezei proteice. Din această cauză, chimioterapia infecţiilor virale rămâne o problemă majoră a cercetării biomedicale. Insuccesele terapiei infecţiilor virale, comparativ cu succesele terapiei infecţiilor bacteriene, se datorează diferenţelor fundamentale între bacterii şi virusuri: bacteriile sunt organisme autonome, cu metabolism propriu, iar virusurile sunt entităţi cu organizare acelulară, care interacţionează cu substratul celular viu într-o modalitate specifică, prezentând un *parazitism absolut, de nivel genetic*, neîntâlnit la bacteriile parazite. Studiile de biologie moleculară identifică funcţiile specific virale ce pot servi ca ţinte pentru acţiunea agenţilor chimioterapeutici: ataşarea, dezvelirea, sinteza acizilor nucleici virali, traducerea, asamblarea şi eliberarea virusurilor. În contrast cu infecţiile bacteriene, la care semnele şi simptomele maladiei însoţesc multiplicarea bacteriană, în cazul infecţiilor virale, simptomele clinice apar numai după o perioadă de incubaţie adecvată, timp în care multiplicarea virală atinge o rată maximă (Topley şi Wilson's, 1990). De aceea, terapia instituită la apariţia semnelor clinice ale infecţiei virale va fi tardivă. S-au identificat totuşi, molecule specifice multiplicării virale şi agenţi chimici care interferă cu aceste molecule şi inhibă multiplicarea virală. Activitatea antivirală a unui compus, demonstrabilă *in vitro*, nu este suficientă pentru a-l utiliza în clinică. Introducerea în clinică a unui agent antiviral este rezultatul unor studii preclinice foarte laborioase.

Agenţii antivirali trebuie să îndeplinească anumite condiţii:

- să prezinte specificitate pentru un ţesut sau organ ţintă, în care este localizată infecţia virală;
- să nu fie toxici pentru celule;
- să fie activi atât intra- cât şi extracelular;
- să fie stabili din punct de vedere metabolic.

Pentru virusurile care formează plaje de liză în monostratul celular, reducerea numărului de plaje sub acţiunea agentului antiviral este testul edificator esenţial al potenţialului său antiviral. Activitatea antivirală este definită de concentraţia inhibitorului care reduce cu 50% numărul plajelor de liză. Reducerea randamentului multiplicării oferă de asemenea informaţii utile, folosind diferite multiplicităţi de infecţie.

Foarte puţine infecţii virale beneficiază de tratamentul chimioterapic: cele produse de *herpesvirusuri* (herpes simplex şi virusul *zona zoster*), infecţia cu *HIV* şi infecţia cu *virusul influenza*. Cele mai bune ţinte pentru inhibiţia cu agenţi antivirali sunt molecule care îndeplinesc o *funcţie specific virală* şi care nu au corespondent în celula gazdă. Pentru a identifica moleculele specific virale cu care pot interacţiona agenţii antivirali, este importantă caracterizarea moleculară a virusului, structura genomului, dar este necesară cunoaşterea evenimentelor moleculare ale multiplicării

virusului. Toate treptele multiplicării virale sunt ţinte potenţiale pentru acţiunea agenţilor antivirali, dar evenimentele timpurii (*ataşarea, penetrarea, dezvelirea*), *sinteza acizilor nucleici şi a proteinelor specific virale, asamblarea şi eliberarea* se aseamănă cu procesele celulare normale şi sunt catalizate, adeseori, de enzime celulare.

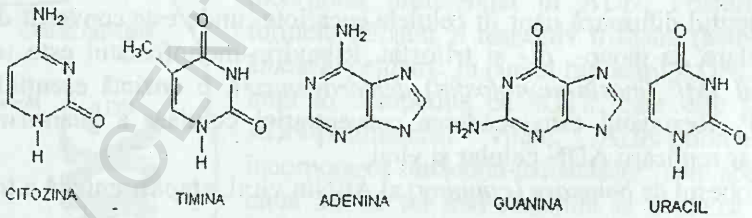
27.1. Analogii nucleozidelor

Sinteza *acizilor nucleici* virali este una dintre ţintele predilecte ale agenţilor antivirali, pentru că se deosebeşte de sinteza acizilor nucleici celulari şi este catalizată de enzime specific virale: *polimerazele ce catalizează sinteza ADN sau ARN viral şi kinazele* care fosforilează nucleozidele sunt ţinte pentru agenţii chimioterapeutici antivirali. Funcţiile acestor enzime sunt adeseori inhibate selectiv de agenţii antivirali, la concentraţii semnificativ mai mici decât cele inhibitoare pentru enzimele omologe ale celulei gazdă. *Timidin-kinazele* catalizează *fosforilarea C5' al pentozei,* prima treaptă a sintezei nucleozidelor pirimidinice (timidina, citidina), pentru a fi încorporate în ADN. *Nucleozid-kinazele* şi *polimerazele ADN* sunt codificate de gene virale şi de gene celulare. Proprietăţile lor diferă foarte mult în ceea ce priveşte specificitatea de substrat, afinitatea de legare şi sensibilitatea faţă de diferiţi compuşi chimici. Pe aceste diferenţe se bazează utilizarea *analogilor nucleozidelor* chimici în terapia antivirală. Analogii nucleozidelor inhibă replicarea acizilor nucleici prin inhibiţia activităţii polimerazelor virale. Unii analogi sunt încorporaţi în molecula de acid nucleic şi blochează creşterea catenei moleculare. Cei mai eficienţi analogi inhibă specific activitatea polimerazelor virale, având efect minim asupra polimerazelor celulare. Variantele virale rezistente apar, uneori cu rapiditate. Administrarea combinaţiei de medicamente întârzie apariţia fenomenelor de rezistenţă.

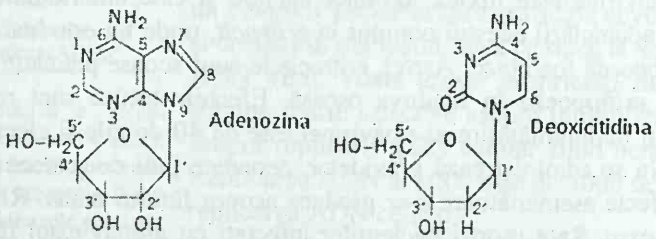
Analogii nucleozidelor sunt fosforilaţi de nucleozid-kinazele virale şi celulare şi sunt încorporaţi în catene ADN de către ADN- polimeraze, intrând astfel în competiţie cu nucleozidele naturale (Bryant, 2001). Analogii vechi ai nucleozidelor (idoxuridina, trifluorotimidina, vidarabina) sunt relativ toxici pentru organismul uman.

Idoxuridina şi *trifluorotimidina* se leagă cu afinitate egală de chinazele virale şi celulare, dar sunt inhibitori mai buni ai ADN-polimerazelor virale. Efectul lor este scăderea ratei de sinteză a ADN în celulele infectate şi neinfectate. Administrarea sistemică a idoxuridinei pacienţilor cu encefalită herpetică, nu a scăzut riscul de deces, iar mielosupresia este accentuată la aproape toţi indivizii trataţi. Insă, compusul este mult mai eficient şi are o toxicitate mult mai scăzută atunci când este administrat local (în keratite herpetice).

Vidarabina este analogul adenozinei. S-a sintetizat şi s-a studiat ca agent antitumoral.

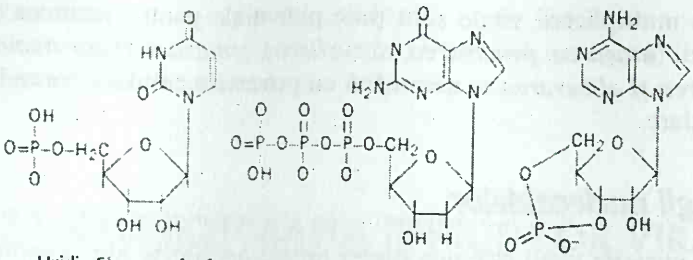


Structura moleculară a bazele azotate componente ale acizilor nucleici. Caracterul aromatic al inelelor purinice şi pirimidinice face ca nucleotidele să absoarbă lumina UV cu spectre caracteristice, ceea ce permite detectarea, identificarea şi quantificarea nucleotidelor şi a derivaţilor lor.



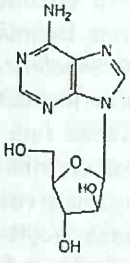
Structura moleculară a nucleozidelor

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

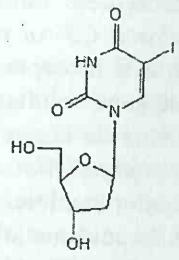


Uridin 5' - monofosfat (UMP) | Deoxiguanozin 5' - trifosfat (dGTP) | Adenozin 3', 5' - monofosfat (AMP ciclic)

Structura moleculară a nucleotidelor



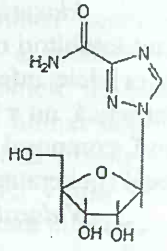
Structura moleculară a vidarabinei



Structura moleculară a idoxuridinei

Ulterior s-a evidențiat că vidarabina este activă față HSV, VZV, CMV, virusul vaccinal și unele retravirusuri tumorale. Mecanismul de acțiune implică fosforilarea nucleozidului de către enzimele celulare și încorporarea în catena de ADN viral și celular, în curs de sinteză, rezultatul fiind încetinirea ratei sintezei ADN. Vidarabin-trifosfatul este un inhibitor competitiv al ADN-polimerazei celulare și virale. Este mai activ față de enzimele virale, ceea ce face să aibă efect inhibitor selectiv față de sinteza ADN viral. Vidarabina inhibă și alte trepte ale sintezei acizilor nucleici: poliadenilarea ARN și deoxinucleotidil-transferaza terminală; inhibă o enzimă de metilare a ARNt și ARNm. Acest efect face ca vidarabina să fie toxică pentru celulele mononucleare. Se folosește ca unguent ocular pentru tratamentul cheratitei herpetice. Pentru tratamentul infecțiilor herpetice prin administrare intravenoasă, vidarabina a fost înlocuită de acyclovir, datorită slabei solubilități în apă și toxicității relativ ridicate.

Ribavirina, un analog sintetic al nucleozidelor purinice (1-β-D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-carboxiamida), a fost sintetizată la începutul anilor '70. Din punct de vedere structural, se aseamănă cu guanozina și inozina. *In vitro* este activă față de o gamă foarte variată de virusuri ADN și ARN: adeno-, herpes-, influenza A și B, virusul respirator sincițial, bunya-, arena-, reo- și HIV.



Structura moleculară a ribavirinei

S-au propus trei mecanisme de acțiune, ceea ce explică spectrul său larg de activitate.

a) Medicamentul difuzează ușor în celulele eucariote, unde este convertit de către enzimele celulare, la mono-, di- și trifosfat. Ribavirin-monofosfatul este un *inhibitor puternic al IMP (inozin-monofosfat) dehidrogenazei*, o enzimă esențială pentru sinteza GTP. Rezultatul este scăderea concentrației celulare a guanozin-nucleotidului, necesar replicării ADN celular și viral;

b) Inhibă procesul de *bonetare* (*capping*) al ARNm viral, etapa esențială a traducerii mesajului în proteine virale;

c) Inhibă direct *ARN-polimeraza* dependentă de ARN a virusurilor influenza și întârzie inițierea și alungirea copiilor de ARNm.

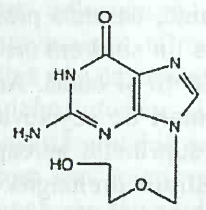
Ribavirina nu este încorporată în structura acizilor nucleici și nici nu determină terminarea transcrierii ARNm. Ribavirina este toxică: produce anemie și este embriotoxică. Anemia apare ca o consecință a difuziei și acumulării acestui compus în *eritrocit*, unde nu este inactivat prin defosforilare, deoarece eritrocitul nu posedă fosfataze. Astfel, eritrocitele sunt scoase prematur din circulație. La doze mari, ribavirina inhibă eritropoeza în măduva osoasă. Efectele toxice sunt reversibile după oprirea tratamentului, dar timpul de înjumătățire al ribavirinei este de 40 de zile și efectele se prelungesc după oprirea tratamentului. Nu se administrează gravidelor, deoarece puii de șoarece se nasc cu malformații scheletice și probabil efecte asemănătoare s-ar produce asupra fătului uman. Ribavirina se folosește în tratamentul *febrei de Lassa*. Rata morții pacienților infectați cu arenavirusul febrei de Lassa este de 55–76%, dar scade la 5–9% la cei tratați. Ribavirina se administrează chiar profilactic la cei cu risc mare

pentru febra de Lassa. Febra de Lassa este o infecție hemoragică, produsă de un arenavirus, răspândită prin urina rozătoarelor infectate, în ariile endemice (în Africa de vest) și adeseori este fatală. După o săptămână de febră și complicații nespecifice, apare hemoragia, în special în tractul gastro-intestinal și chiar moartea prin șoc hipovolemic. Febra hemoragică cu sindrom renal este cauzată de virusul Hantaan (un bunyavirus), transmis prin urina rozătoarelor.

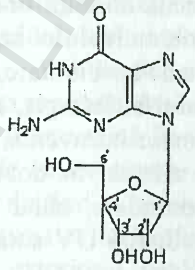
Medicamentul traversează bariera hemato-encefalică și în lichidul cerebrospinal realizează concentrații de 50–100% din cele serice. De aceea se folosește pentru tratamentul *encefalitelor*. În 1986 a început administrarea sub formă de aerosoli pentru tratamentul infecțiilor cu virusul respirator sincițial.

Analogii nucleozidici utilizați în prezent în chimioterapia antivirală, sunt mai puțin toxici: *acyclovir* este activat numai în celulele infectate de virus, iar *zidovudina* inhibă reverstranscriptaza, enzimă absentă în celulele normale ale organismului.

Acyclovir cunoscut sub denumirea comercială de *zovirax* (9-(2-hidroxietoximetil) guanina), are cel mai bun index terapeutic dintre toți agenții antivirali în uz și este intens utilizat pentru tratamentul infecțiilor cu virusul *herpes simplex* (Gold și Corey, 1986). A fost descoperit în anii '70 de către Elion și colab., într-un screening pentru compuși cu activitate antivirală. Din punct de vedere chimic, este un analog structural al *guanozinei*, care în locul *ribozei*, la baza azotată este atașată *o catenă laterală neciclică*. Acyclovir inhibă multiplicarea HSV-1, HSV-2, VZV, cu toxicitate minimă pentru celulă. Este mai puțin eficient față de EBV, CMV sau HH-6 (Acosta și Balfour, 2001). Selectivitatea acțiunii sale față de virusurile herpetice derivă din faptul că este activată numai în celulele infectate, fiind fosforilată la ACV-monofosfat de timidin-kinază virală.



Structura moleculară a acyclovir



Structura moleculară a guanozinei

Acyclovir difuzează liber în toate celulele, infectate și neinfectate, dar se activează și se acumulează numai în celulele infectate cu herpesvirusuri, deoarece prima treaptă a activării sale, *fosforilarea* în poziția 5' a catenei laterale, este catalizată numai de o *timidin-kinaza* (enzimă care catalizează fosforilarea C5' al pentozei, prima etapă a modificării nucleozidelor pirimidinice pentru încorporarea în ADN) specific virală și în măsură nesemnificativă, de timidin-kinaza celulară.

Afinitatea Tk HSV pentru acyclovir este de circa 3 milioane de ori mai mare decât a Tk celulare.

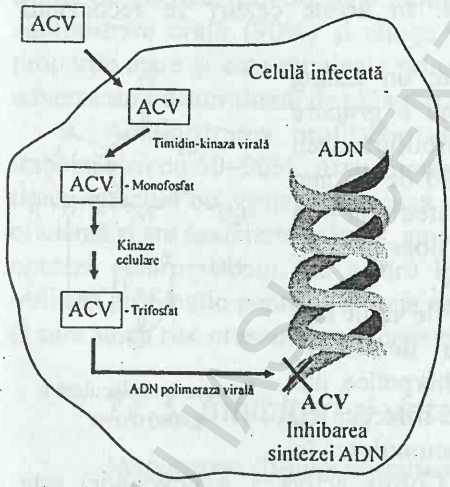


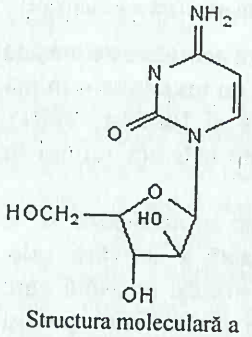
Fig. 455. Ilustrarea schematică a mecanismului de acțiune a acyclovir (ACV). Timidin-kinaza virală catalizează conversia ACV la ACV-monofosfat, iar treapta a II-a a fosforilării este catalizată de kinazele celulare. ADN-polimeraza virală încorporează ACV-trifosfat în ADN și blochează sinteza ADN.

Acyclovir este fosforilat mult mai rapid și de aceea este încorporat preferențial în ADN. Fosforilările ulterioare la formele difosfat și respectiv trifosfat (activ) sunt catalizate de *kinazele* celulare. În cursul replicării ADN, acyclovir-trifosfatul intră în competiție cu dGTP, care este substratul natural al ADN-polimerazei virale. ADN-polimerazele catalizează încorporarea nucleotid-trifosfaților: cele specific virale sunt de circa 30 de ori mai sensibile la acțiunea inhibitorului, decât ADN-polimeazele umane. Datorită faptului că molecula de acyclovir încorporată nu oferă gruparea 3'OH, următoarea nucleotidă nu mai este legată și replicarea ADN este blocată. Odată cu legarea moleculei de acyclovir la ADN, se formează un *complex ternar* la care participă acyclovir, ADN-polimeraza și următorul nucleotid, ceea ce duce la scăderea amplă a sintezei ADN viral. Toate aceste proprietăți fac ca acyclovir să aibă acțiune foarte selectivă asupra multiplicării virale, efectele sale asupra replicării ADN celular fiind nesemnificative (fig. 455). Replicarea ADN al HSV este de 3000 de ori mai sensibilă decât replicarea ADN celular.

Virusurile care codifică sinteza unor enzime ale căror omologe există și în celulă, au avantajul că se pot multiplica în

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIOLOGIE

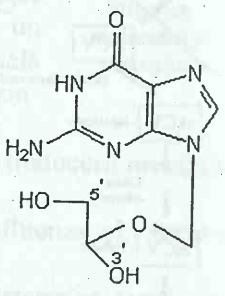
celulele care nu se divid. Herpesvirusurile se deosebesc foarte mult între ele, în privința sensibilității la acyclovir (Bacon și colab., 2003). HSV este un amestec de tulpini Tk^+ și Tk^-. Tulpinile Tk^- au capacități limitate de a stabili infecții latente în neuroni, care să se și activeze. Predomină tulpinile Tk^+, deoarece sunt mai neurovirulente și au avantajul selectiv de a stabili infecții latente în ganglionii senzitivi, cu capacitatea de reactivare. Astfel, HSV-1 și HSV-2 sunt extrem de sensibile, necesitând *in vitro* concentrații de 0,04–0,4 μg/ml pentru a obține inhibiția replicării cu 50%. În schimb, Tk VZV nu fosforilează acyclovir la fel de eficient ca enzima omologă de la HSV-1 și HSV-2. Astfel se explică sensibilitatea de 8–10 ori mai mică a VZV la acyclovir. CMV necesită concentrații foarte mari de acyclovir pentru blocarea multiplicării virale, deoarece acest virus nu codifică o Tk proprie. Nu se știe dacă virusul Epstein-Barr codifică o Tk capabilă să activeze acyclovir. Acyclovir nu poate acționa în faza de latență a nici unuia dintre virusurile herpetice. Un avantaj major al tratamentului cu acyclovir îl reprezintă absența unor efecte grave de toxicitate. Administrarea intravenoasă produce o creștere tranzitorie a nivelului seric de creatinină, datorată probabil unei obstrucții la nivelul tubilor renali. În literatura de specialitate, a fost descris un sindrom neurologic tranzitoriu, ale cărui manifestări clinice sunt confuzia, letargia, rareori halucinații și comă. Acest sindrom apare la pacienții imunosupresați, care primesc intravenos doze foarte mari de acyclovir. Acyclovir previne recurența herpetică. După aplicare zilnică, în doze mici, sunt suprimate aproape complet recurențele frecvente. Nu produce efecte secundare, chiar după administrare prelungită. Dacă este administrat profilactic, la pacienții expuși radiației UV solare sau artificiale, acyclovir oral scade frecvența leziunilor herpetice, care se declanșează în intervalul 2–7 zile, dar nu influențează leziunile care apar în primele 48 de ore de la expunerea la agenții declanșatori. Leziunile care apar în primele 48 de ore sunt consecința reactivării unor tulpini mai virulente, pe fondul unei reactivități imunitare suboptimale. Acyclovir reduce la 14% morbiditatea encefalitei herpetice.



Structura moleculară a citozin-arabinozidei

Rezistența la acyclovir se instalează după administrarea pentru perioade lungi de timp, a dozelor care nu suprimă multiplicarea virală. În condițiile presiunii selective, datorată administrării acyclovir, tulpinile Tk^+ nu se pot multiplica și o proporție importantă de virioni suferă conversie de la Tk^+ la Tk^- sau la forme care au capacitate redusă de a codifica Tk. Astfel de mutante sunt rezistente, deoarece nu fosforilează acyclovir. După oprirea tratamentului, tulpinile Tk^- reversează la Tk^+. Un alt mecanism de rezistență este expresia unei ADN-polimeraze cu afinitate redusă pentru acyclovir-trifosfat și respectiv, expresia unei Tk cu proprietăți alterate de legare a medicamentului. În aceste cazuri se recomandă administrarea *foscarnet*, cu un mecanism de acțiune diferit.

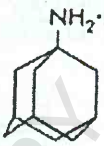
Gancyclovir (1,3-dihidroxi-2-propoximetil guanina), este un analog nucleozidic asemănător acyclovir, cu deosebirea că mai conține o *grupare hidroximetil* ce se comportă asemănător cu gruparea 3'hidroxil a ribofuranozei. Este activ față de toate virusurile herpetice umane și este de 100 de ori mai eficient în comparație cu acyclovir, față de CMV uman. Toxicitatea este însă mult mai mare decât a acyclovir și din această cauză este folosit doar în cazul pacienților imunocompromiși cu infecții severe provocate de CMV.



Structura moleculară a gancyclovir

Nu se cunoaște mecanismul care face ca *gancyclovir* să fie mult mai eficient decât acyclovir în tratamentul infecțiilor produse de CMV. Gancyclovir este activat specific în celulele infectate cu virusuri herpetice, dar în special de Tk codificată de gena UL97 a CMV. În celulele infectate cu CMV, gancyclovir este activat de *timidin-kinaza celulară* și se acumulează în concentrație mai mare decât acyclovir. Gancyclovir-trifosfat (forma activă a gancyclovir) este încorporat în catenele ADN virale, ceea ce duce la scăderea ratei replicării genomului viral. Datorită prezenței grupării 3'OH, gancyclovir nu funcționează ca un terminator al sintezei catenei DNA. Acest compus are efecte mitogene asupra celulelor mamaliene, este carcinogen și embriotoxic. La om produce efecte toxice asupra măduvei osoase, la circa 25% dintre cazurile tratate. Studii recente au arătat că la 8% dintre pacienții tratați cu gancyclovir pentru o perioadă mai mare de 3 luni, tratamentul a eșuat, ceea ce sugerează posibilitatea selectării unor tulpini virale rezistente la acest compus.

27.2. Amine ciclice

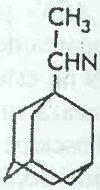


Structura moleculară a amantadinei

Adamantanii (amantadina şi derivatul ei *α-metil-amantadina* sau *rimantadina)* sunt utilizaţi pentru tratamentul infecţiilor cu virusul influenza. Din punct de vedere chimic, sunt *amine ciclice* care derivă formal de la hidrocarbura policiclică *adamantan.*

Amantadina este o amină triciclică, derivatul 1-amino al adamantanului, un compus complex cu 10 atomi de C, cu o structură de colivie.

Rimantadina este un derivat aproape identic, metilat, al amantadinei. Ambele inhibă multiplicarea virusului influenza A *in vitro* şi *in vivo*, dar nu inhibă virusul influenza B.



Structura moleculară a rimantadinei

Mecanismul de acţiune şi spectrul activităţii antivirale sunt identice, însă rimantadina este metabolizată diferit de amantadină şi produce efecte secundare (febră, insomnie, dificultăţi de concentrare). Amantadina blochează faza timpurie a infecţiei – *dezvelirea* – dar influenţează şi fazele tardive ale multiplicării: asamblarea virionilor şi înmugurirea (Brady şi colab., 1990). Sensibilitatea virusurilor gripale la amantadină este determinată de prezenţa proteinei M_2 la nivelul membranei plasmatice a celulelor infectate şi în cantitate foarte mică în structura virionilor. S-a presupus că, această proteină ar forma *canale ionice* care ar permite trecerea protonilor din endosom spre interiorul virionului, ducând la scăderea pH, ceea ce determină eliberarea nucleoproteinei virale în citoplasma celulei infectate. În cursul procesului de asamblare virală, protonii sunt transferaţi invers, la exteriorul veziculei de exocitoză, proteina M_2 menţinând nivelul pH peste valoarea la care intregritatea hemaglutininei virale ar fi afectată şi nu ar mai putea fi încorporată în peplosul viral. Se pare că amantadina blochează mecanismul de transfer al protonilor mediat de proteina M_2, inhibând dezvelirea virionilor, maturarea virionilor sau ambele procese. În absenţa acidifierii regiunii centrale a virionului în endosom, proteina M_1 nu se disociază de complexul ribonucleoproteic şi acesta nu este transferat spre nucleu. Amantadina este mai eficace dacă în organism se găsesc anticorpii specifici preformaţi. *In vitro*, la concentraţii mult mai mari, adamantanii blochează multiplicarea şi a altor virusuri ARN: influenza B şi paramixovirusuri. Din această cauză, adamantanii se folosesc doar pentru tratamentul infecţiilor cu influenza A. Variantele virale rezistente apar rapid, în 5–7 zile de terapie: 16–45% dintre izolate virale pot fi rezistente.

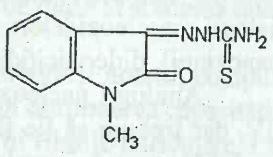
Ambele medicamente se găsesc în formulări pentru administrare orală. Amantadina atinge nivelul maxim în plasmă la 2–4 ore după administrarea orală şi peste 90% reapare nemodificată în urină. Se excretă prin secreţie tubulară şi filtrare glomerulară. Rimantadina se absoarbe bine după administrare orală (90%) şi atinge valori plasmatice inferioare amantadinei. Este metabolizată în proporţie mare şi este eliminată prin mecanisme renale. Circa 10% se elimină nemodificată. Efectele adverse sunt determinate de tulburări ale activităţii SNC: nervozitate, vertigo, insomnie.

Administrarea profilactică a celor doi compuşi, în cazul unei epidemii, reduce riscul îmbolnăvirii cu 50–90%. Ambii compuşi sunt mai eficienţi în prevenirea apariţiei simptomelor clinice tipice infecţiei cu virusul influenza A, decât în prevenirea apariţiei infecţiei propriu-zise. Deşi este eficientă şi are toxicitate scăzută, amantadina a fost un eşec comercial, deoarece majoritatea indivizilor optează pentru vaccin sau pentru îmbolnăvire, decât să facă profilaxie zilnică. Rimantadina este utilizată profilactic pentru a proteja persoanele care nu au fost vaccinate sau nu pot beneficia de vaccin şi care au un risc crescut de a face complicaţii consecutive infecţiei cu virusul gripal A.

27.3. Inhibitori ai sintezei proteinelor virale: β-thiosemicarbazone

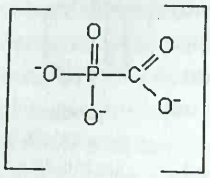
Methisazone (β-thiosemicarbazone) este un compus sintetic antiviral, inhibitor al multiplicării poxvirusurilor.

Pentru ca efectele inhibitorii să fie demonstrabile, compusul trebuie să fie administrat la iniţierea procesului infecţios. Mecanismul de acţiune este ipotetic: pare să inhibe traducerea ARNm viral tardiv. Consecinţa este o reducere netă a sintezei proteinelor virale tardive, prin dezorganizarea polisomilor. Odată cu eradicarea variolei, medicamentul a ieşit din uz.



Structura moleculară a methisazonei

27.4. Foscarnet



Structura moleculară a foscarnet

Foscarnet (fosfono-formiat trisodic) este un analog al pirofosfatului, care nu se aseamănă cu nici un alt medicament antiviral utilizat în clinică. A fost sintetizat la sfârşitul anilor '70 ca o alternativă (mai puţin toxic şi mai eficient) la acidul fosfonoacetic. Medicamentul este foarte util pentru tratarea infecţiilor cu virusuri herpetice rezistente la acyclovir.

Spre deosebire de compuşii antivirali analogi ai bazelor azotate, *foscarnet* nu necesită o activare prealabilă sub acţiunea kinazelor virale sau celulare. Foscarnet funcţionează ca un *inhibitor necompetitiv al ARN- şi ADN-polimerazelor*, legându-se la situsul de legare al pirofosfatului şi inhibă necompetitiv legarea de substratul nucleotidic (Piret şi colab., 2001). Deşi mecanismul inhibiţiei sintezei ARN şi ADN nu este cunoscut cu exactitate, una dintre ipoteze sugerează că forcarnet legat la polimerază, formează un intermediar instabil cu nucleozid-monofosfaţii, conducând la degradarea acizilor nucleici. Foscarnet inhibă *polimerazele celulare* cât şi pe cele *virale*, dar enzimele virale sunt mult mai sensibile decât cele celulare (cele virale sunt inhibate de concentraţii de 1/2 – 1/10 din cele necesare pentru inhibarea enzimelor celulare): inhibă polimerazele unor tulpini ale serotipului A de virus gripal, ale virusurilor herpetice umane, virusului hepatitei B şi reverstranscriptaza HIV. Foscarnet s-a dovedit a fi extrem de eficient în tratarea pacienţilor SIDA, infectaţi cu tulpini de HSV sau VZV rezistente la aciclovir.

Foscarnet are unele dezavantaje majore. Se administrează intravenos şi dozele trebuie să se repete la intervale scurte, pentru că timpul de înjumătăţire este foarte scurt (Noormohamed şi colab., 1998). De aceea, se încearcă mărirea timpului de înjumătăţire prin conjugare cu alcooli cu catena lungă (derivaţi de la acizi graşi). Un alt dezavantaj, o consecinţă a structurii sale chimice, este că la pH fiziologic acest compus este ionizat şi traversează foarte greu membrana plasmatică celulară. În LCR, concentraţia de foscarnet este de aproximativ 40% faţă de cea plasmatică. Aproximativ 30% din cantitatea de foscarnet se depozitează în oase, ceea ce determină o creştere a timpului de înjumătăţire la câteva luni (Sjovall şi colab., 1989). Medicamentul produce efecte adverse: perturbarea funcţiei renale, induce dezechilibre electrolitice (Ca^{2+}, PO_4^{2-}, K^+, Mg^{2+}). Are acţiune chelatoare intensă pentru ionii bivalenţi, în special Ca^{2+}, producând scădere severă, în funcţie de doză, ce poate fi fatală.

27.5. Chimioterapia infecţiei cu HIV

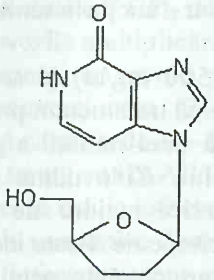
Interesul pentru terapia infecţiei cu HIV este justificat de numărul în continuă creştere al persoanelor infectate. Astfel, la sfârşitul anului 1999, 34,3 milioane persoane erau infectate sau manifestau semnele clinice ale SIDA. În fiecare zi, se infectează circa 15000 de persoane. 95% din totalul persoanelor infectate se găsesc în ţările în curs de dezvoltare. Până în 1999, 18,8 milioane adulţi şi copii au murit de SIDA, de la recunoaşterea epidemiei ca entitate clinică. Găsirea unor modalităţi eficiente de stopare a multiplicării virale este foarte importantă pentru clinică, deoarece SIDA se corelează cu un titru viral crescut. Medicaţia anti-HIV încearcă să blocheze multiplicarea virusului în oricare treaptă a ciclului său (Schwartz şi Nair, 1999). În interiorul celulei, blocarea ciclului de multiplicare este posibilă prin inhibiţia reverstranscriptazei sau a proteazei HIV.

Medicamentele cu o relativă eficienţă anti-SIDA intră în 3 categorii majore:
– analogi ai nucleozidelor, ce acţionează ca inhibitori ai reverstranscriptazei;
– inhibitori nenucleozidici ai reverstranscriptazei;
– inhibitorii activităţii proteazei.

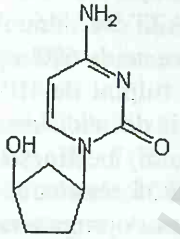
Reverstranscriptaza este enzima virală care converteşte informaţia genetică virală ARN, într-o moleculă complementară de ADN dublu catenară. Inhibiţia reverstranscriptazei este produsă de analogii nucleozidelor: zidovudina (azidotimidina – AZT), dideoxiinozina (DDI) (analogă guanozinei), dideoxicitidina (DD).

Analogii nucleozidelor se aseamănă cu substanţele naturale care intră în compoziţia ADN al HIV, dar trebuie să fie fosforilaţi de enzimele celulare, deoarece virusul nu codifică Tk. Dincolo de punctul încorporării analogilor bazelor, reacţia de polimerizare şi de sinteză a ADN HIV este blocată. Selectivitatea acţiunii lor s-a datorat inhibiţiei reverstranscrierii. Compuşii din prima generaţie au

produs toxicitate pe termen lung: mitocondrială (didanozina), nefrotoxicitate (cidofovir). Ulterior s-au selectat analogi ai nucleozidelor şi nucleotidelor mai puţin toxici. Primul compus al grupului este zidovudina (Gotzsche, 1993).

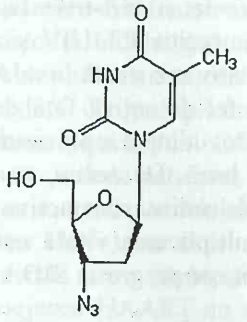


Structura moleculară a dideoxiinozinei



Structura moleculară a dideoxicitidinei

Zidovudina (3'-azido-3'-deoxitimidina), analog al deoxitimidinei, denumită anterior *azidotimidina* (AZT), este un compus de sinteză din familia analogilor nucleozidici dideoxi, la care grupările OH 2' şi 3' ale inelului β-D-ribofuranozic au fost înlocuite cu atomi de hidrogen şi respectiv cu gruparea azidă (N_3).



Structura moleculară a zidovudinei

Iniţial (Horwitz, 1964), compusul a fost utilizat pentru proprietăţile sale antineoplazice, iar ulterior s-au descoperit cele antivirale (inhibitor al virusului leucemiei felinelor). În 1985 s-a descoperit capacitatea sa de a inhiba HIV. Compusul a devenit disponibil pentru clinică în 1987, iar în prezent se foloseşte în schema tratamentului infecţiei cu HIV (De Cock şi colab., 1993; Zhou şi colab., 1999). Compusul este fosforilat de către *timidin-kinaza celulară*, în celulele infectate şi neinfectate, la derivaţii mono-, di- şi trifosfat care reprezintă formele active. Forma fosforilată directă este inactivă, deoarece nu traversează membrana. Zidovudin-trifosfatul, forma activă a AZT, este un *inhibitor competitiv al reverstranscriptazei HIV*. Zidovudin-trifosfatul are o afinitate de 100 de ori mai mare pentru reverstranscriptază (Km mic) decât pentru substratul natural deoxitimidin-trifosfatul (dTTP) (Km mare). Zidovudin-trifosfatul este încorporat în lanţul ADN în curs de sinteză, ca *AZT-monofosfat* şi datorită faptului că în poziţia 3' se află gruparea azido- şi nu o grupare hidroxil, următorul nucleotid nu se poate lega şi sinteza ADN este stopată. Reverstranscriptaza nu excizează AZT încorporată. Zidovudina este activă faţă de retravirusuri mamaliene şi aviare şi faţă de virusul Epstein-Barr. AZT se găseşte în formulări pentru administrare orală şi parenterală. La concentraţia de 1–5 μm, AZT inhibă activitatea RT, dar nu inhibă replicarea ADN celular. După administrare orală, AZT se absoarbe repede şi total, cu valori maxime în sânge la 30–90 min. Pătrunde în LCR şi, de aceea, AZT este folosită pentru tratamentul manifestărilor neurologice ale SIDA. Este catabolizată în ficat, în principal prin conjugare cu *acidul glucuronic*. Din acest motiv, metabolizarea zidovudinei este blocată de alţi compuşi care sunt catabolizaţi pe aceeaşi cale la nivel hepatic (agenţi anti-inflamatori nesteroidici, analgezice narcotice). Un dezavantaj al acestui compus este timpul de înjumătăţire foarte scurt la nivel plasmatic, fapt pentru care necesită administrare frecventă, dar în celulă stabilitatea sa este net superioară. AZT traversează bariera placentară.

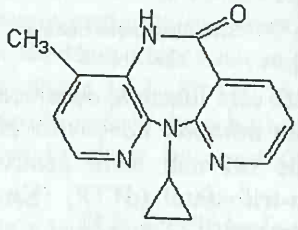
Deşi celulele mamaliene nu posedă reverstranscriptaza, totuşi AZT are toxicitate moderată. Zidovudin-monofosfatul inhibă competitiv timidilat-kinaza, enzima care catalizează conversia nucleozid-monofosfatului, la nucleozid-difosfat (Chun şi colab., 2001). De aceea, în celulele infectate şi în cele normale, nivelul intracelular de nucleozid di- şi trifosfaţi scade, ceea ce duce la scăderea ratei sintezei ADN.

AZT este toxică pentru măduva osoasă. Efectele secundare ale administrării acestui compus sunt: anemie severă, neutropenie, dureri de cap, miopatie manifestată clinic prin diminuarea capacităţii contractile a musculaturii, iar anatomic, prin apariţia mitocondriilor anormale în fibrele musculare. La pacienţii supuşi tratamentelor cu zidovudină, creşte riscul de a dezvolta limfoame non-Hodgkin, probabil ca o consecinţă a imunosupresiei îndelungate (Hoggard şi colab., 2001). La pacienţii cu

SIDA, supuşi unui tratament de lungă durată cu zidovudină, s-a constatat instalarea unei rezistenţe a virusului HIV faţă de acest compus. AZT se foloseşte pentru tratamentul tuturor stadiilor infecţiei cu HIV. Dozele mari de 1200–1500 mg/zi prelungesc supravieţuirea, reduc frecvenţa infecţiilor oportuniste, bolnavul câştigă în greutate, viremia diminuează, iar funcţia imunitară se ameliorează (Kakuda şi colab., 2001).

În prezent, AZT se administrează în doze mici (300–500 mg/zi) şi are efecte secundare limitate. Doza optimă este de 600 mg/zi (Cato şi colab., 1998). După tratamentul prelungit mai mult de 6 luni, se selectează tulpini de HIV rezistente la AZT, datorită unei mutaţii a genei care codifică reverstranscriptaza şi de aici decurge ineficienţa tratamentului. Zidovudina nu elimină şi nu neutralizează virusul, ci încetineşte evoluţia SIDA. Efectele toxice majore ale AZT se produc la nivelul măduvei hematoformatoare, cu monocitopenie şi granulocitopenie. Poate induce anemie severă şi necesită transfuzie sau oprirea terapiei. Dozele mari produc o stare de rău general şi dureri de cap.

Didanozina (2'–3' dideoxiinozina – ddI) este un dideoxinucleozid, analog al deoxiadenozinei. Enzimele celulare o convertesc la ddI-monofosfat, apoi la dideoxiadenozin (ddA)-monofosfat, ddA-difosfat şi ddA-trifosfat (ddATP), forma activă. Ca şi trifosfaţii altor dideoxinucleozide, ddATP inhibă competitiv RT HIV şi acţionează ca terminator al catenei de ADN. ADN-polimeraza α umană este relativ rezistentă la ddATP, dar variantele β şi γ sunt mai sensibile. *In vitro*, ddATP intracelulară este la fel de activă faţă de RT HIV, ca şi zidovudina. Este activă faţă de tulpinile HIV rezistente la zidovudină. La pH acid gastric, ddI este inactivată datorită hidrolizei legăturii glicozidice dintre glucid şi bază. De aceea, se administrează în asociaţie cu un tampon al acidităţii gastrice. Acyclovir şi zidovudina sunt active numai faţă de virusurile care se multiplică, iar după oprirea tratamentului, multiplicarea virală este reluată. Acyclovir nu împiedică recurenţele ulterioare, iar zidovudina nu opreşte progresia SIDA, ceea ce denotă că aceşti agenţi nu elimină virusurile în stare latentă.



Structura moleculară a neviparinei

O altă clasă de medicamente sunt *inhibitorii nenucleozidici* ai reverstranscriptazei. Compuşii din această categorie (neviparina) sunt inhibitori direcţi ai RT HIV, deoarece interacţionează cu proteina şi alterează conformaţia situsului catalitic. O singură mutaţie, chiar punctiformă a genei RT, este adeseori suficientă pentru a diminua eficienţa acestor compuşi.

În tratamentul infecţiilor virale, se foloseşte de asemenea o altă clasă de agenţi chimici care sunt *inhibitorii proteazei*. Proteaza HIV este o aspartic-protează, codificată de virus şi are rolul de a genera peptide structurale dintr-un precursor viral. Inhibitorii proteazei sunt reprezentaţi de *molecule peptidice mici*, care mimează substratul natural al reacţiei (Ikuta şi colab., 2000). Ele acţionează prin blocarea situsului catalitic al proteazei HIV, împiedicând generarea proteinelor virale prin clivarea precursorilor şi astfel este stopat procesul maturării virale. O singură mutaţie a genei ce codifică sinteza proteazei HIV este suficientă pentru a face ca medicamentele să devină ineficiente.

N-butyldeoxynojirimycin (N-butyl-DNJ) elimină complet HIV din celulele infectate cronic (Fischer şi colab., 1995). Compusul acţionează prin inhibiţia glicozilării gp120 a învelişului viral, reducând capacitatea ei de a se lega de receptorii CD_4. Glicozilarea glicoproteinelor virale este nespecifică şi este catalizată de enzimele celulare, dar activitatea N-butyl-DNJ, *in vitro*, este foarte specifică faţă de celulele infectate cu HIV.

O altă ţintă a terapiei infecţiei cu HIV este ARNm. Principiul constă în construcţia oligonucleotidelor mici, complementare genelor virale sau secvenţelor ARNm (oligonucleotide antisens). Acestea se leagă de acidul nucleic şi blochează sinteza proteinelor. Deoarece gena *rev* are rol reglator esenţial, s-a obţinut ARN-anti ARNm al acestei gene. Efectul a fost inhibiţia sintezei proteinelor în celulele infectate cronic, *in vitro*.

Interferenţa cu prima treaptă a ciclului infecţios – legarea HIV de receptorul CD_4 al membranei limfocitare – a fost propusă ca o modalitate de tratament. CD_4 solubil recombinat este o moleculă incompletă, din care lipsesc secvenţele transmembranară şi citosolică, care se leagă cu gp120 şi împiedică legarea virusului de limfocitele T_{CD4}. Preparatul nu este toxic, dar timpul de înjumătăţire este foarte scurt.

Strategia curentă pentru terapia infecţiei HIV este denumită HAART (*Highly Active Anti-Retraviral Therapy*) şi utilizează combinaţii ale diferitelor medicamente: un *inhibitor al proteazei*,

asociat cu *doi analogi nucleozidici inhibitori* ai reverstranscriptazei (Blazevic şi colab., 2001). La pacienţii supuşi terapiei HAART, infecţia unor noi celule nu este complet blocată. HIV persistă, cu o rată foarte scăzută a multiplicării în *rezervorul celular* reprezentat de macrofage, celule T CD_4 neangajate şi chiar celulele T CD_4 de memorie, ceea ce permite eliberarea virionilor progeni şi infecţia unor noi celule. Dovezile multiplicării HIV la pacienţii trataţi HAART sunt următoarele:

- mulţi pacienţi au nivele plasmatice scăzute ale ARN viral, sub limita de detectare prin testele convenţionale (200–500 copii/ml), dar detectabile prin metode sensibile care determină cantităţi de 10–50 de copii ARN/ml;
- pacienţii trataţi cu HAART devin aviremici, dar prin metoda hibridizării *in situ* sau RT-PCR se detectează celule infectate productiv, care exprimă ARN HIV-1 (Servais şi colab., 2001);
- diferenţele cantitative dintre ADN-HIV total şi integrat în celulele TCD_4 sugerează existenţa celulelor infectate recent cu HIV-1, în care ADN este neintegrat. Acestea sunt copii lineare complete revers-transcrise, care suferă o reacţie aberantă de legare cap la cap, în loc să se integreze în cromosomul gazdei.

Pentru eliminarea rezervorului de virus se impune creşterea dozei terapeutice combinate care să inhibe complet multiplicarea virusului. Dar, rezervorul de virus are o persistenţă îndelungată, iar terapia HAART este toxică. Pentru eliminarea rezervoarelor de virus se propune stimularea transcrierii şi multiplicării virale în celulele infectate latent, sub acţiunea *citokinelor*. Odată cu multiplicarea virusului, celulele mor datorită efectului citopatic sau expun antigene virale şi devin ţinta acţiunii litice a limfocitelor TCD_4 citolitice. Astfel, o combinaţie de IL-2, IL-6 şi TNFα poate induce activarea şi multiplicarea virusului în celulele infectate latent, *in vitro*. IL-2 produce creşterea numerică a celulelor T CD_4, dar nivelul viremiei a rămas nemodificat. Celulele infectate latent cu HIV-1 nu exprimă receptori de înaltă afinitate pentru IL-2, citokina poate activa multiplicarea virală prin intermediul receptorilor de mică afinitate sau indirect prin alte citokine ale cascadei. Asocierea HAART cu un agent care să activeze specific numai celulele TCD_4 infectate latent, ar fi soluţia terapeutică ideală. Terapia multiplă reduce riscul emergenţei unei tulpini virale cu rezistenţă multiplă.

Terapia anti-HIV este ineficientă datorită unor particularităţi moleculare şi biologice ale HIV:

- genomul viral se integrează într-un cromosom celular şi infecţia rămâne latentă o perioadă nedefinită;
- virusul se poate disemina prin transfer intercelular direct, fără o fază extracelulară;
- virusul infectează celule circulante (limfocite, macrofage) şi se diseminează sistemic;
- virusul poate infecta celule ale SNC şi agenţii terapeutici ar trebui să depăşească bariera hemato-encefalică;
- virusul scapă acţiunii Ac specifici şi rămâne infecţios;
- apariţia frecventă a variantelor antigenice.

Imunoglobulinele antivirale sunt disponibile în 3 variante:

- preparatul de globuline imune (IG) pentru injectare intramusculară;
- preparatul de imunoglobuline pentru injectare intravenoasă (IVIG) ;
- preparate de imunoglobuline injectabile intravenos, cu titru înalt de anticorpi.

Toate variantele se obţin din plasma umană şi conţin predominant IgG, dar şi alte izotipuri. Se pot obţine preparate cu un titru înalt de imunoglobuline faţă de anumite antigene virale, prin imunizarea animalelor. Preparatul IG nu poate fi administrat intravenos, datorită tendinţei IgG de a forma agregate, care, *in vivo*, fixează complementul. Imunoglobulinele sunt mai eficiente dacă sunt administrate profilactic, decât terapeutic. Preparatele IG se folosesc în primul rând pentru prevenirea hepatitei A şi se administrează pacienţilor, în câteva zile după consumul alimentelor contaminate. Preparatele IG hiperimune obţinute prin imunizarea animalelor se administrează postexpunere la VHB şi la virusul rabic. Preparatul IG specific antirabic se obţine din plasma donorilor hiperimunizaţi.

27.6. Imunoterapia

Variabilitatea genetică a HIV a împiedicat dezvoltarea unui protocol al imunizării SIDA. S-au obţinut anticorpii anti-proteină de înveliş gp120, pentru blocarea interacţiunii gp120 şi implicit a infecţiei (Takeda şi colab., 1992). Dar, abordarea n-a avut succes, deoarece gena ce codifică gp120

suferă mutații și rezultă variante antigenice ale proteinei care nu sunt recunoscute de Ac (Cease și colab., 1987). S-au obținut vaccinuri subunitare, prin inserția câtorva gene ce codifică proteine ale învelișului HIV, în genomul virusului vaccinal sau adeno-, ca vectori de expresie clonați în sisteme celulare. S-a încercat vaccinarea cu *virus inactivat*. Preparatul viral inactivat are utilizare limitată numai la indivizii infectați cu HIV, deoarece metodele de inactivare nu au un grad de certitudine de 100% și pot fi însoțite de păstrarea unei infecțiozități reziduale. Există încercări de a obține *virus atenuat infecțios* pentru a-l folosi ca agent imunizant, deoarece indivizii infectați cu HIV-2 cauzează o formă mai ușoară de SIDA, cu o perioadă de latență mai lungă și protejează față de infecția cu HIV-1.

27.7. Rezistența virală la agenții chimioterapeutici

Având o structură genetică relativ simplă și fiind metabolic inerte, virusurile au puține mecanisme de a dobândi rezistența la agenții chimioterapeutici.

Virusurile au două proprietăți care le permit să scape de acțiunea inhibitorilor:

– multiplicarea la un titru înalt în celula gazdă sensibilă;

– apariția mutațiilor cu o rată înaltă.

Mutația este forța motrice a evoluției sistemelor vii. Virusurile nu întrunesc criteriile minimale ale celui mai simplu sistem viu, dar evenimentele mutaționale au o frecvență mare.

Cele mai multe virusuri cu *genom ADN*, au rate de mutație inferioare ribovirusurilor. Mutabilitatea lor este puțin cunoscută, dar este dedusă indirect din diferite observații: de exemplu, virusurile herpetice pot deveni rezistente la medicația antivirală, fapt ce creează dificultăți clinice.

In general, *genomul ribovirusurilor* are dimensiuni reduse, iar rata de mutație/nucleotid/tur de multiplicare este maximă, fapt care permite o rată de evoluție de milioane de ori mai rapidă decât a gazdelor lor. Supuse permanent presiunii selective a factorilor de apărare a gazdei, evoluția virusurilor este exclusiv *adaptativă*. Ratele foarte înalte de mutație, generează așa numitele "mutante de roire" sau populații de *quasispecii* de virusuri, care conferă o mare adaptabilitate multiplicării virale, menită să compenseze șansa minimă a interacțiunii cu substratul permisiv.

Dar, rata mutației nu trebuie să depășească un "prag al erorilor", care ar genera un virus incapabil de multiplicare. Quasispeciile de virusuri ARN, se adaptează la un prag de erori mutaționale, compatibil cu multiplicarea. Se consideră că virusurile se multiplică la limita superioară a mutabilității și adaptabilității. Datorită ratei înalte a mutației, clonele de ribovirusuri și retravirusuri sunt quasispecii sau "mutante roitoare", care prezintă variații genetice genomice. Populațiile de quasispecii conferă virusurilor cu genom ARN o adaptabilitate perfectă la mediul gazdei și o capacitate de evoluție foarte rapidă. Anumite secvențe ale genomului sunt mai stabile decât altele, dar și cele mai stabile suferă mutații cu o rată superioară în raport cu dezoxiribovirusurile.

Mutabilitatea accentuată se datorează naturii intrinseci a funcției ARN-polimerazei virale, predispusă la erori ("*error prone*"), ca o consecință a absenței funcției de corectare (*proof reading*), în timp ce majoritatea ADN-polimerazelor virale își corectează erorile proprii. Diferitele familii de ribovirusuri au rate diferite de mutație. Dintre enzimele de transcriere și replicare a genomului ARN, RT are o predispoziție mai accentuată la erori, ceea ce se corelează cu o rată înaltă a mutației în ciclul de multiplicare a retravirusurilor. Genomul integrat ca ADN proviral este copiat de aparatul enzimatic al celulei, cu o fidelitate relativă și de aceea, retravirusurile endogene evoluează foarte lent, comparativ cu cele exogene (infecțioase).

Modificarea ARN posttranscriere este o cauză majoră a apariției mutațiilor. Modificarea extensivă s-a descris inițial pentru ARNm al proteinei M (matrix) a virusului rujeolic de la pacienții cu PESS.

În contrast cu modificarea frecventă adenozină – inozină (A-I) la unele virusuri ARN, există câteva cazuri de ARN viral și celular la care conversia A – I, catalizată de ADAR, are loc cu selectivitate înaltă, la poziții specifice ale A. De exemplu, la HDV, ARN editing are rol esențial pentru sinteza a două proteine cu funcții diferite, de la un ORF: sinteza AgD se face după conversia selectivă a codonului terminal amber UAG, la codonul Trp UIG. Antigenul D este o proteină bazică fosforilată și se acumulează în nucleii celulelor infectate. Este componenta internă a HDV. Mecanismul generării celor două variante este următorul: în timpul replicării genomului, o fracție a copiilor de ARN antigenomic, suferă unul sau mai multe evenimente de "editing" post-transcriere. Unul dintre ele este

esențial: *A* din mijlocul codonului terminal *amber* UAG al ARN codificator al *Ag D de 195 aminoacizi*, este dezaminată de o enzimă a celulei. Dezaminarea *A* are importanță biologică majoră. Conversia *A* la *I* (*Inozină*) modifică mesajul ARN, deoarece *I* este recunoscută ca *G* (nu ca A). Molecula de ARN astfel modificată este tradusă într-o proteină a cărei secvență de aminoacizi diferă față de a proteinei native. Codonul terminal *amber* este înlocuit cu codonul (UIG) pentru sinteza Trp. ARNm modificat, codifică o proteină mai mare – *antigenul D de 214 aminoacizi*, o proteină bazică, fosforilată care se acumulează în nucleul celulei infectate.

Pentru virusurile cu genom ARN de polaritate negativă, *hipermutația datorată dezaminării A* este asociată cu *persistența* infecției. Pentru virusurile cu genom ADN dc, modificarea reprezintă un mecanism prin care copiile de ARNm timpuriu sunt inactivate.

Marea diversitate a ribovirusurilor se explică prin mutabilitatea accentuată și *adaptabilitatea* lor. Cu puține excepții, virusurile capabile să infecteze insecte și animale superioare sau insecte și plante au genom ARN. Adaptabilitatea quasispeciilor le permite deplasarea între diverse medii selective. Adeseori, numai una sau câteva schimbări mutaționale permit unui virus să dobândească virulență, să-și schimbe tropismul și să devină rezistent la un medicament antiviral sau la anticorpii specifici. Variațiile secvenței de baze a quasispeciilor pot influența *severitatea infecției virale*. Faptul este extrem de important pentru cercetători și pentru clinicieni, care tind să considere virusul rujeolic, HIV, virusul hepatitei C sau polio, ca entități infecțioase unice, la care diferiții pacienți răspund diferit. Se ignoră natura fundamentală a ribovirusurilor, adică mutabilitatea lor accentuată, materializată în existența quasispeciilor. Heterogenitatea quasispeciilor, caracterul tranzitoriu, întâmplător, nedeterminat și imprevizibil al apariției lor, creează o genetică aleatorie, contraintuitivă. Baza ubicvității ribovirusurilor este chiar heterogenitatea lor genetică. Existența quasispeciilor ridică probleme insurmontabile controlului majorității infecțiilor cu ribovirusuri, prin intermediul vaccinurilor. Vaccinarea a avut succes pentru unele viroze (produse de virusul polio, rujeola, oreionul, variola), deoarece anumiți epitopi antigenici ai proteinelor virale, au o probabilitate mică de a se modifica fără să compromită infecțiozitatea lui. Dar, pentru alte ribovirusuri (FMDV, HIV_1, virusul hepatitei C) natura efemeră a quasispecilor pune probleme dificile în calea identificării epitopilor stabili (sau puțin variabili) și imunizanți (stimulatori ai răpunsului imun protector). Cele mai multe virusuri ARN, suferă o divergență evolutivă, prin substituția bazelor cu o rata de $1/10^2$–10^4/nucleotide/an. Rata evoluției virusurilor nu este constantă. Apariția unor noi ribovirusuri în viitor, este o certitudine. Unele apariții se vor datora contactului omului cu virusuri "vechi" de la animalele junglei neexplorate, iar altele vor apărea prin *recombinare, reasortare* sau prin *mutație*. Apariția este însă condiționată de evoluția rapidă a quasispeciilor și de capacitatea lor de adaptare rapidă la gazda umană. Adaptarea rapidă va determina transmiterea epidemică sau pandemică la om, așa cum se întâmplă cu influenza A, HIV_1, sau va implica omul ca o gazdă sporadică (virusul febrei hemoragice etc.). Este foarte probabil ca majoritatea ribovirusurilor umane, să fi evoluat în ultimele mii sau zeci de mii de ani, dar unele sunt mult mai recente. După Brown (1989), virusurile "noi" au evoluat din interacțiunile genelor cromosomale, cu elemente genetice mobile și cu virusurile "vechi" și din acest punct de vedere, evoluția virusurilor este un proces care nu se termină niciodată. După Botstein (1981), produsul evoluției virale nu este un virus anume, ci o familie de elemente genetice denumite *module*, fiecare dintre ele purtând o funcție biologică particulară. Fiecare virus este rezultatul unei combinații favorabile de module. Recombinarea genetică furnizează noi variante de module, din care se perpetuează cele mai adaptate.

De cele mai multe ori, *rezistența este rezultatul mutației genetice*, care produce modificări ale enzimelor sau ale componentelor structurale ale virionului. Eficiența acestui mecanism se observă în culturile celulare, unde virusurile dezvoltă rezistență după numai câteva pasaje, în prezența agentului inhibitor. Rezistența herpesvirusurilor, la pacienții imunocompetenți apare rareori, însă tulpinile rezistente de virus influenza apar cu frecvență mare. În general, virusurile rezistente la acțiunea agenților chimioterapeutici, par să aibă o virulență redusă și produc infecții mai ușoare, în special herpesvirusurile. Tulpinile rezistente de influenza A sunt la fel de virulente ca și tulpinile naturale. Detectarea și evaluarea genelor de rezistență se face prin diferite metode. Cele tradiționale implică inocularea culturilor celulare cu virusuri, expunerea la agenți inhibitori și determinarea modificărilor ulterioare în celulă sau a cantității de virus progen. Metoda nu este totdeauna relevantă pentru populațiile de virusuri *in vivo*. Virusurile

izolate de la pacienți sunt populații heterogene, cu sensibilitate diferită la agenții inhibitori și chiar cu proprietăți diferite de multiplicare în diferite substraturi celulare. Metodele noi pentru detectarea genelor de rezistență sunt cele moleculare, inclusiv PCR.

Evoluția procesului infecțios are caracteristici strict individuale, datorate particularităților genetice ale gazdei și ale agentului infecțios. De aceea, scopul geneticii medicale este *medicina personalizată*. Intr-un scenariu (puțin probabil) al viitorului fiecare individ ar trebui genotipizat pentru un număr cât mai mare de locusuri, cu scopul de a identifica sensibilitatea genetică individuală la diferite maladii infecțioase sau neinfecțioase.

Optimiștii speră că medicina poate fi schimbată de la artă la știință, prin dezvoltarea farmacogeneticii. Farmacogenetica este influențată de absorbția medicamentului, de distribuția sa la situsul acțiunii, de interacțiunea cu țintele sale (enzime sau receptori), de metabolizare și de excreție.

Metabolizarea medicamentului este o etapă esențială a farmacogeneticii și este dependentă de citocromii P_{450}. Genele codificatoare CYP formează o familie cu peste 57 de alele funcționale și peste 33 de pseudogene. Produsele genelor catabolizează o varietate largă de substraturi. Modificările constau în oxidări, peroxidări, reduceri. La om, medicamentele sunt metabolizate de produsele a 35 gene CYP (1, 2, 3 și mai puțin 4). De exemplu, codeina este metabolizată la morfină (un analgezic). Cei cu deficit al CYP2D6 nu resimt efectul analgezic al codeinei. Antidepresivele triciclice (nortriptilina), dacă sunt metabolizate rapid, au efect terapeutic minim, iar cei care le metabolizează insuficient resimt efectele secundare. Agenții chimici ce reglează contracțiile inimii induc efecte secundare, dacă nu sunt metabolizate suficient.

Bibliografie

Lehninger A. L. 1975. Biochimie, vol. I, Traducere după ediția a II-a, Editura Tehnică București.

Hoggard P. G., Sales S.D., Phiboonbanakit D., Lloyd J., Maher B. A., Khoo S. H., Wilkins E., Carey P., Hart C. A., Back D. J. 2001. Influence of Prior Exposure to Zidovudine on Stavudine Phosphorylation In Vivo and Ex Vivo – Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(2): 577–582.

Kakuda T. N., Page L. M., Anderson P. L., Henry K., Schacker T. W., Rhame F. S., Acosta E. P., Brundage R. C., Fletcher C. V. 2001. Pharmacological Basis for Concentration-Controlled Therapy with Zidovudine, Lamivudine, and Indinavir – Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(1): 236–242.

Bryant M. L., Bridges E. G., Placidi L., Faraj A., Loi A. G. and colab. 2001. Antiviral l-Nucleosides Specific for Hepatitis B Virus Infection – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(1): 229–235.

Cato A. III, Qian J., Hsu A., Levy B., Leonard J., Granneman R. 1998. Multidose Pharmacokinetics of Ritonavir and Zidovudine in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(7): 1788–1793.

Schwartz S. A., Nair M. P. 1999. Current Concepts in Human Immunodeficiency Virus Infection and AIDS – Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 6(3): 295–305.

Zhou X. J., Sheiner L. B., D'Aquila R. T., Hughes M. D., Hirsch M. S., Fischl M. A., Johnson V. A., Myers M., Sommadossi J. P. 1999. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators, Population Pharmacokinetics of Nevirapine, Zidovudine, and Didanosine in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(1): 121–128.

Acosta E. P., Balfour H. H. Jr. – Acyclovir for Treatment of Postherpetic Neuralgia: Efficacy and Pharmacokinetics 2001. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(10): 2771–2774.

Bacon T. H., Levin M. J., Leary J. J., Sarisky R. T., Sutton D. 2003. Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir and Penciclovir after Two Decades of Antiviral Therapy – Clin. Microbiol. Rev. 16(1): 114–128.

Gold D., Corey L. 1987. Acyclovir prophylaxis for herpes simplex virus infection – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 31(3): 361–367.

Brady M. T., Sears S. D., Pacini D. L., Samorodin R., DePamphilis J., Oakes M., Soo W., Clements M. L. 1990. Safety and prophylactic efficacy of low-dose rimantadine in adults during an influenza A epidemic – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 34(9): 1633–1636.

Noormohamed F. H., Youle M. S., Higgs C. J., Martin-Munley S., Gazzard B. G., Lant A. F. 1998. Pharmacokinetics and Absolute Bioavailability of Oral Foscarnet in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(2): 293–297.

Piret J., Lamontagne J., Désormeaux A., Bergeron M. G. 2001. Efficacies of Gel Formulations Containing Foscarnet, Alone or Combined with Sodium Lauryl Sulfate, against Establishment and Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus Type 1 – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(4): 1030–1036.

Sjövall J., Bergdahl S., Movin G., Ogenstad S., Saarimäki M. 1989. Pharmacokinetics of foscarnet and distribution to cerebrospinal fluid after intravenous infusion in patients with human immunodeficiency virus infection – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33(7): 1023–1031.

De Cock K. M., Lucas S. B., Lucas S., Agness J., Kadio A., Gayle H. D. 1993. Clinical research, prophylaxis, therapy, and care for HIV disease in Africa – American Journal of Public Health 83(10): 1385–1389.
Gøtzsche P. 1993. Zidovudine dosage. Nordic Medical Research Councils' HIV Therapy Group – British Medical Journal 307(6905): 682–683.
Fischer P. B., Collin M., Karlsson G. B., James W., Butters T. D., Davis S. J., Gordon S., Dwek R. A., Platt F. M. 1995. The alpha-glucosidase inhibitor N-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding – Journal of Virology 69(9): 5791–5797.
Blazevic V., Jankelevich S., Steinberg S. M., Jacobsen F., Yarchoan R., Shearer G. M. 2001. Highly Active Antiretroviral Therapy in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Children: Analysis of Cellular Immune Responses – Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8(5): 943–948.
Chun T. W., Justement J. S., Moir S., Hallahan C. W., Ehler L. A., Liu S., McLaughlin M., Dybul M., Mican J. M., Fauci A. S. 2001. Suppression of HIV replication in the resting $CD4^+$ T cell reservoir by autologous CD8 + T cells: Implications for the development of therapeutic strategies – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(1): 253–258.
Takeda A., Robinson J. E., Ho D. D., Debouck C., Haigwood N. L., Ennis F. A. 1992. Distinction of human immunodeficiency virus type 1 neutralization and infection enhancement by human monoclonal antibodies to glycoprotein 120 – The Journal of Clinical Investigation 89(6): 1952–1957.
Cease K. B., Margalit H., Cornette J. L., Putney S. D., Robey W. G., Ouyang C., Streicher H. Z. 1987. Helper T-cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency syndrome virus gp120 envelope protein and induction of immunity in mice to the native protein using a 16-residue synthetic peptide – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84(12): 4249–4253.
Servais J., Lambert C., Fontaine E., Plesséria J. M., Robert I. 2001. Comparison of DNA Sequencing and a Line Probe Assay for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations in Patients Failing Highly Active Antiretroviral Therapy – Journal of Clinical Microbiology 39(2): 454–459.
Ikuta K., Suzuki S., Horikoshi H., Mukai T., Luftig R. B. 2000. Positive and Negative Aspects of the Human Immunodeficiency Virus Protease: Development of Inhibitors versus Its Role in AIDS Pathogenesis – Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(4): 725–745.
Hirsch M., Kaplan J. C., D'Aquila R. T. 1996. Antiviral Agents, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Norkin L. C. 1995. Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and the Design of Antiviral Agents – Clinical Microbiol. Rev., 8, 2, 1 : 293–315.
Bean B. 1992. Antiviral therapy: curent concepts and practices – Clin. Microbiol. Rev. 5, 146–182.
De Clercq E. 1997.In search of a selective antiviral chemotherapy – Clin. Microbiol. Rev. 10, 674—693.
Field, H. J., Vere Hodge R. A. 2007. Antiviral Agents, în vol. Encyclopedia of Virolgy, third edition, Editors Brian V. J. Mahy, Marc H. V. van Regenmortel, AP.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA A III-A. MICOLOGIE MEDICALĂ

28. NOŢIUNI INTRODUCTIVE DE MICOLOGIE

28.1. Caracterizarea generală a regnului Fungi

În prezent sunt descrise circa 70.000 de specii de fungi, deşi unele estimări sugerează că numărul este mult mai mare, putând să ajungă la aproximativ 1,5 milioane specii.

Din totalul celor peste 70.000 de specii descrise, mai puţin de 400 au importanţă medicală şi mai puţin de 50 produc mai mult de 90% din totalul infecţiilor fungice la om şi animale. Cele mai multe specii fungice sunt benefice pentru om şi sunt esenţiale pentru degradarea şi reciclarea materiei organice. Fungii au un rol deosebit de important în natură, deoarece, fiind în primul rând *descompunători ai materiei organice*, redau elementele biogene (C, H, O, N, S, P etc.) circuitului natural. Potenţialul degradativ al fungilor este foarte mare, datorită complexităţii şi diversităţii enzimelor pe care le secretă. Grupul fungilor descompune toate categoriile de macromolecule caracteristice lumii vii: polizaharide, acizi organici, lignine, hidrocarburi aromatice şi alifatice, zaharuri, alcooli, aminoacizi, purine, lipide, proteine, acizi nucleici. Descompunerea substratului necesită *acţiunea cooperantă* a mai multor specii de microorganisme.

Acţiunea degradativă a fungilor produce mari pierderi de fructe şi a altor produse vegetale în depozite. Fructele uscate (în special prunele) sunt vulnerabile la atacul fungic, deoarece suprafaţa lor e bogată în glucide. Cerealele depozitate şi furajele sunt deteriorate de fungi dacă nu sunt bine uscate la momentul depozitării.

Fungii au o importanţă economică de prim ordin, atât prin potenţialul lor distructiv, cât şi în *bioindustria micologică* (panificaţie, producerea antibioticelor, a acizilor organici etc.). Levurile sunt utilizate în *producerea industrială a băuturilor alcoolice de fermentaţie* (vin, bere, whisky) şi în *industria panificaţiei*, iar *Claviceps purpurea* (cornul secarei) este folosită ca sursă de medicamente (ergotina). Fungii paraziţi prezintă un *interes medical* major datorită frecvenţei mari a infecţiilor micotice (micoze) la om şi animale: *Pneumocystis* (produce pneumonia la persoanele imunosupresate), *Ajellomyces* (produce blastomicoza şi histoplasmoza), *Cryptococcus* (produce meningita la persoane imunodeprimate) etc.

Fungii *patogeni pentru plante* reprezintă un domeniu cu implicaţii teoretice, dar în special pentru producţia agricolă: ruginile, tăciunii, mălurile produc pierderi economice foarte mari în culturile de cereale. Fungii paraziţi pătrund în organismul vegetal prin înţepăturile insectelor, prin deschideri naturale (stomate) şi prin invazia directă a epidermei.

Unele ciuperci macroscopice sunt *comestibile*, altele sunt *otrăvitoare*, datorită toxinelor pe care le sintetizează. *Morchella* (zbârciogul) şi *Tuber* (trufe) sunt ascomicete comestibile. *Tuber* este o ciupercă sferică subterană, care creşte în jurul anumitor specii de stejar. Savoarea unică a acestor ciuperci le face să fie foarte căutate de gastronomi, deşi valoarea lor nutritivă este scăzută.

Dintre macromicete, *Agaricus bisporus* este cultivată în amenajări speciale.

Cei mai importanţi fungi din grupul deuteromicetelor aparţin genului *Penicillium*. Unele specii de *Penicillium* sunt producătoare de *penicilină*. Altele (*P. roqueforti* şi *P. camemberti*) conferă savoarea distinctă şi consistenţa moale a brânzeturilor de Roquefort şi Camembert, datorită proteazelor eliberate în substrat. Miceliul se dezvoltă preponderent la suprafaţă, dar pătrunde şi în substrat şi prin acţiunea sa enzimatică îi diminuează consistenţa şi îi conferă o savoare unică.

Fungii patogeni pentru om trăiesc în sol şi pătrund în organism pe cale respiratorie, fiind inhalaţi odată cu aerul. De la poarta de intrare, agentul infecţios se diseminează în organism şi se instituie o infecţie cronică, cu simptome foarte variate. Infecţiile fungice fatale sunt rare.

Nutriția. Majoritatea fungilor sunt organisme *saprobionte*, adică trăiesc pe materia organică vegetală în descompunere și folosesc moleculele simple eliberate prin hidroliza macromoleculelor. Un număr important de fungi sunt *biotrofi* (adică trăiesc în relație directă cu alte organisme): unii realizează asociații simbiotice cu plantele (inclusiv cu algele), cu animalele (artropode) și cu procariotele, rezultând licheni, micorize sau fungi endofitici din frunze și tulpini. Circa 80% dintre plante au micorize. Fungii endofitici ar proteja plantele de ierbivore și ar influența, prin sinteza fitohormonilor, biologia reproducerii.

Fiziologia fungilor prezintă următoarele trăsături generale:

- sunt strict aerobe;
- se adaptează la condiții de viață foarte severe: sunt mult mai plastice decât alte microorganisme, sunt rezistente la presiune osmotică ridicată și cresc pe substraturi cu concentrații înalte de glucide pe care bacteriile nu le suportă;
- tolerează variații mari de pH (până la valoarea 9) al mediului și cresc la concentrații înalte de acid (pH 2), cu valoarea optimă de 5,6;
- absorb apa din mediu și din atmosferă, dar rezistă în medii deshidratate, inhibitoare pentru bacterii;
- temperatura optimă de creștere este de 22–30°; pot crește și la 0°; unele sunt termofile (62°);
- glucoza este zahărul metabolizat de toți fungii; sucroza, maltoza, amidonul, celuloza sunt metabolizate de mulți fungi filamentoși;
- sursa de azot este amoniul, nitratul sau peptona;
- necesită P, Zn, Cu, Mg, Mo;
- sunt foarte eficiente în conversia nutrienților în material celular. Dacă nutrienții sunt în exces, fungii secretă diferite produse în mediul extracelular.

Cultivare. În laborator, fungii cresc pe medii naturale (mustul de malț, morcov, pâine) sau pe medii sintetice: Raulin, Sabouraud (dextroză-agar), Czapek.

Primul stadiu în formarea unei colonii pe suprafața unui mediu solid îl constituie apariția unor filamente miceliene în masa substratului solid. Pe măsură ce hifele devin tot mai dense, încep să apară hifele aeriene ale miceliului, care poartă organele de înmulțire. Datorită conidiilor care se formează în număr mare și care de obicei sunt colorate (cenușiu, negru, galben, brun, verde, albastru), coloniile apar colorate, iar miceliul este, de regulă, alb.

In vitro, creșterea fungică prezintă două tipuri morfologice distincte: cea de *levură* și *forma filamentoasă*. Aparatul vegetativ al fungilor filamentoși este reprezentat de o împletire de filamente denumite *hife*, cu diametrul de 2–10 μm, care formează miceliul.

Hifele care alcătuiesc miceliul constau fie din celule alungite, așezate cap la cap, separate prin septe, cu unul sau doi nuclei (miceliu septat) sau hifa este formată dintr-o celulă unică, mult alungită ca un tub și ramificată, nedivizată de septe, cu numeroși nuclei. Un astfel de miceliu este denumit *coenocitic*. Ascomicetele (*Aspergillus, Penicillium*) de importanță medicală au rareori hife septate. Hifele care penetrează mediul și absorb nutrienții se numesc *vegetative* sau de *substrat*. Hifele aeriene poartă structuri reproducătoare. *In vitro* formează colonii cu textură și pigmentație caracteristice. Levurile și fungii filamentoși care sintetizează *pigmenți* melanici localizați în peretele celular sunt reuniți în grupul *dematiaceae*. Pigmenții conferă nuanța caracteristică atât coloniilor crescute pe mediul solidificat, cât și leziunilor tegumentare.

Majoritatea fungilor filamentoși izolați în clinică se pot determina pe criterii *morfologice* ale sporilor de reproducere asexuată (conidii), prin examenul microscopic.

Levurile sunt unicelulare, de formă sferică sau elipsoidală, cu diametrul de 3–15 μm și se reproduc prin înmugurire. Unele specii formează muguri care nu se detașează, se alungesc și continuă procesul de înmugurire. Se formează astfel un lanț de celule alungite, denumite *pseudohife*. Coloniile de levuri sunt moi, opace, cu diametrul de 1–3 mm. Aspectul coloniilor și morfologia microscopică a speciilor de levuri sunt asemănătoare. Din acest motiv, levurile se identifică prin *teste fiziologice*.

Fungii se reproduc pe cale asexuată și sexuată (fig. 456). Reproducerea asexuată include propagarea vegetativă a hifelor și a levurilor, precum și prin formarea sporilor asexuați (fructificarea vegetativă). Hifele cresc printr-o zonă limitată a vârfului, unde peretele celular este subțire și foarte elastic. Creșterea apicală poate fi însoțită de excrescențe laterale, acestea fiind primordiile hifelor laterale, care la rândul lor se pot ramifica.

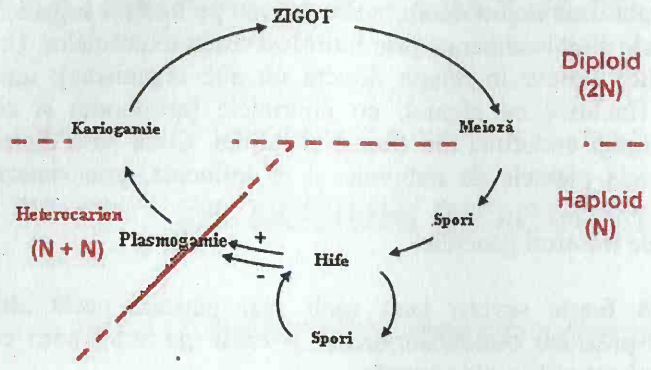


Fig. 456. Reprezentarea ciclului de viață sexuat şi asexuat la fungi (Gregory, 2006).

Unele specii de fungi sunt *dimorfice*: cresc ca levură sau ca hife filamentoase, în funcție de condițiile de mediu.

Fungii se înmulțesc prin spori, care se pot forma pe cale asexuată sau pe cale sexuată. Sporii sexuați se formează după procesul de încrucișare între cele două celule polarizate sexual.

Pentru formarea sporilor asexuați nu există celule polarizate sexual şi nici fuziune. Sporii se formează prin diviziune mitotică a unor celule specializate, pe hife miceliene denumite sporofori.

Levurile se reproduc asexuat prin *înmugurire*. Procesul începe cu formarea unei excrescențe pe celula mamă, ce creşte progresiv şi devine celula fiică (denumită blastoconidie). Istmul dintre cele 2 celule se rupe odată cu formarea peretelui septal. Unele levuri se propagă atât sub formă de levură, cât şi ca hife.

Diferențierea *sporilor asexuați* constituie forma de fructificare vegetativă. Pentru formarea sporilor asexuați, nu există celule polarizate sexual şi nici fuziune celulară. Sporii se formează prin *diviziune mitotică* a unor celule specializate, pe hife miceliene denumite *sporofori*. Sporii (conidii, sporangiospori, artrospori şi blastospori) sunt rezistenți la condițiile nefavorabile, se formează în culturi şi rareori se diferențiază în stadiul parazit. Morfologia sporilor asexuați este un criteriu de identificare.

La eumicete (fungi perfecți), sporii sexuați se formează prin procesul *fructificării sexuate*. Reproducerea sexuată urmează aceiaşi cale ca şi la organismele eucariote superioare: nucleii a 2 celule haploide *polarizate sexual*, fuzionează şi formează un *zigot diploid*. Nucleul diploid suferă diviziunea *meiotică* şi rezultă nuclei haploizi, în jurul cărora se diferențiază spori haploizi zigospori, ascospori şi bazidiospori.

Sporii pot fi exogeni şi endogeni. Sporii *exogeni* se formează pe hife denumite *conidiofori*. Celulele terminale ale conidioforului denumite *sterigme*, se divid în mod repetat prin înmugurire sau prin strangulare şi formează sporii denumiți *conidii*. Uneori, conidioforul este septat şi ramificat.

Sporii *endogeni* se formează pe un sporofor denumit *sporangiofor*, într-o structură terminală denumită *sporangiu*. Partea sporoforului care se inserează în sporangiu se numeşte *columelă*. Sporii rezultă prin diviziunea celulelor columelei în sporangiu şi se eliberează prin ruperea sau dizolvarea peretelui său.

Fungii imperfecți (deuteromicete) sunt aceia pentru care formele de fructificare sunt necunoscute sau lipsesc.

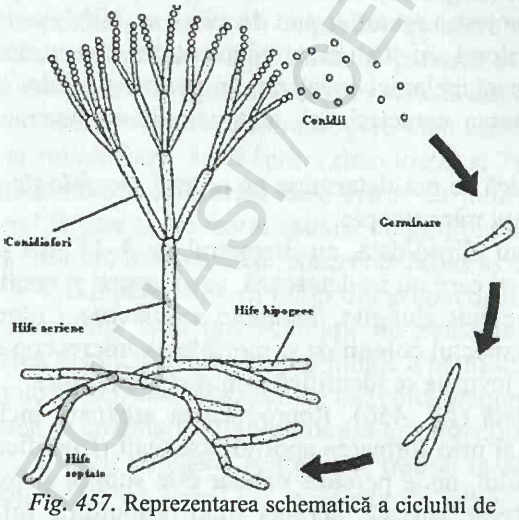


Fig. 457. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare asexuată a unui fung cu miceliu septat, prin spori exogeni (CliffsNotes.com., 2010).

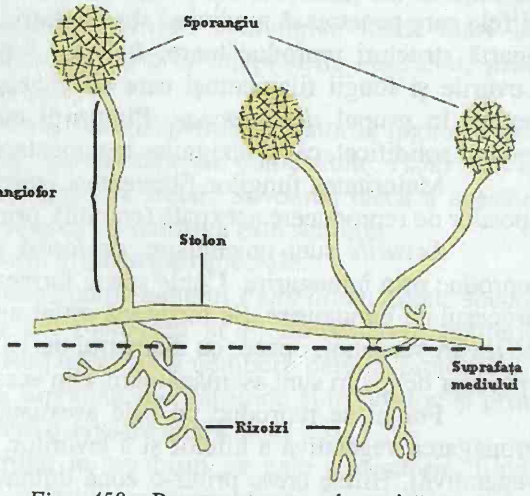


Fig. 458. Reprezentarea schematică a structurii zigomicetelor, care se reproduc prin endospori (SparkNote on Fungi, 2010).

Clasa *Chytridiomycota* cuprinde fungi filalamentoşi inferiori de apă, cu hife miceliene coenocitice, care se înmulţesc prin spori mobili (zoospori).

Clasa *Zygomycota* include fungii filamentoşi cu miceliu de obicei neseptat (*Mucor, Rhizopus)*, care se înmulţesc prin spori endogeni sau conidii, formate pe hife specializate numite conidiofori, cu o varietate de forme. Coloniile fungice sunt afânate, de obicei pudrate, din cauza tendinţei de a creşte compact pe substrat şi sunt colorate la fel ca şi conidiile: negre, brune, galbene, verzi, verzi-albăstrui.

Ascomycota formează cel mai mare şi diversificat grup de fungi, cu circa 2000 de genuri. Grupul include *levurile* (*Saccharomyces, Candida*), *fungii filamentoşi (Aspergillus, Penicillium)* şi pe cei care produc majoritatea micozelor la om, boli caracteristice la plante denumite *făinări,* precum şi fungi cu pălărie: *Morchella* (zbârciogul) şi *Tuber* (trufele).

Majoritatea sunt specii terestre, dar un număr considerabil populează apele dulci sau sărate, saprobionte pe resturile vegetale în descompunere, iar unele sunt parazite sau trăiesc în asociaţii reciproc benefice, cu alte microorganisme sau cu unele plante.

Multe ascomicete saprobionte sunt foarte specializate şi cresc numai pe anumite părţi în descompunere ale unor specii de plante, iar cele parazite sunt restrânse la anumite ţesuturi ale gazdei (de exemplu, peţiolul frunzei). Un număr important de reprezentanţi ai grupului sunt paraziţi ai plantelor şi mai puţini ai insectelor sau altor animale.

Ascomicetele se reproduc pe cale sexuată şi asexuată. Caracteristica acestui grup de fungi este că *sporii sexuaţi*, denumiţi *ascospori*, se formează într-o structură în formă de sac, denumită *ască.*

Asca este o celulă care se formează prin procesul de fuziune a unor structuri tubulare a două celule învecinate haploide, polarizate sexual. Iniţial fuzionează numai masele citoplasmatice, prin procesul de *plasmogamie*. Plasmogamia poate fi rezultatul unirii a două celule similare sau hife, ori prin unirea heterogenă a două celule diferite, diferenţiate, denumite *gametangii*, unul mascul şi unul femel, sau a unui gametangiu femel cu o celulă masculină detaşată (spermatie).

Basidiomycota *sunt fungii cei mai evoluaţi. Miceliul este pluricelular şi se distinge prin organul sporifer denumit* bazidie, *în care se formează bazidiosporii.*

Grupul bazidiomicetelor include 20–30.000 de specii, cu morfologie diferită a talului, în funcţie de modul de viaţă: saprobionte sau parazite. Din acest grup fac parte fungii gelatinoşi, fungii care produc boli la plante (rugini, tăciuni, măluri), fungii consolă, care se dezvoltă pe scoarţa copacilor, fungii macroscopici comestibili şi necomestibili.

Denumirile comune se referă la partea vizibilă a ciupercii, denumită *bazidiocarp*, susţinut de un miceliu asimilator bine dezvoltat, care pătrund în substrat (solul sau materialele vegetale), pe care ciuperca fructifică.

Pe imaginile electrono-optice, peretele la *S. cerevisiae* este stratificat: un strat extern *fibrilar*, format în special din manoproteine, şi un strat *intern* amorf. Stratul intern poate să conste din 2 zone: una internă, în raport cu membrana, bogat în proteine, şi o zonă externă, bogată în manan.

Structura peretelui celulari

Din punct de vedere chimic, peretele constă din 3 componente de bază, interconectate: *β-glucanul, chitina* şi *mananul.*

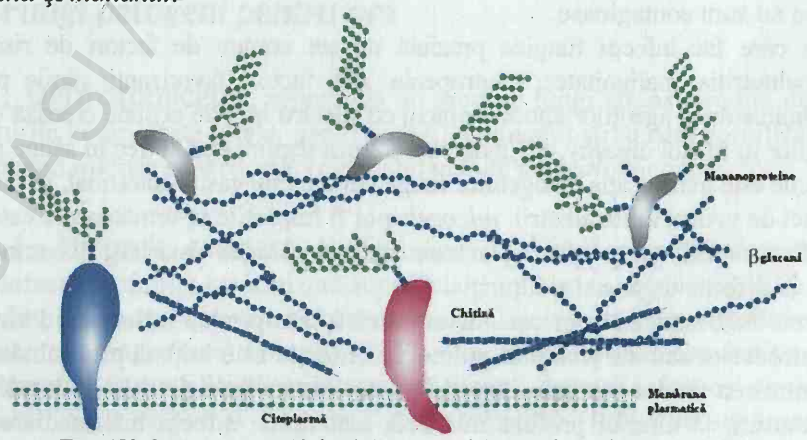


Fig. 459. Structura peretelui celular la fungi (Cummings şi Doering, 2009).

Glucanul β-1,4 este un polimer linear format din unități de β-D-glucoză, ramificat cu resturi legate β-1,6. Este componenta principală a peretelui şi formează rețeaua în care sunt ancorate manoproteinele (mananul). Glucanul determină rigiditatea peretelui şi forma celulei.

Chitina este un polimer linear de β-1,4-N-acetilglucozamină, un component minor al peretelui. Lanțurile lineare de polizaharid se asociază cu fibrilele stratului extern, prin legături de H între resturile catenelor adiacente. Se formează astfel o structură cristalină a peretelui.

Deşi, cantitativ minoră, prin depunerea sa specifică în regiunea septului, chitina este importantă pentru stabilitatea mecanică a joncțiunii temporare dintre celula mamă şi celulele fiice. În celulele vegetative, chitina este limitată la inelul ce delimitează septul în celulele care înmuguresc sau în cicatricea pe peretele celulei mamă.

Mananul este un polimer format din unități de D-manoză (lipseşte la fungii filamentoşi), la care se asociază proteinele, clasificate în 2 grupe:

- manoproteine structurale ale peretelui celular;
- enzime localizate în peretele celular sau în spațiul periplasmic, cu rol trofic sau morfogenetic sau sunt implicate în procesul de secreție, ca invertaza sau fosfataza acidă.

Manoproteinele structurale ale peretelui celular sunt molecule mari, care conțin glucide în proporție de 95%. Componenta proteică are rol fundamental în procesul de biosinteză, ca acceptor al diferitelor catene glucidice.

La suprafața peretelui se găsesc structurile care mediază ataşarea fungilor de celula gazdă. Polizaharidele parietale pot activa complementul şi se eliberează anafilatoxinele stimulatoare ale procesului inflamator. Polizaharidele parietale ale fungilor sunt greu degradabile sub acțiunea enzimelor lizosomale.

28.2. Tipuri de infecții fungice

Fungii sunt agenți patogeni majori ai plantelor şi insectelor, dar sunt mai puțin importanți ca agenți patogeni ai vertebratelor. Creşterea fungilor în țesuturile gazdelor animale şi umane poartă denumirea generică de *micoză*. Gravitatea micozelor variază, de la cele care produc un disconfort minim, până la cele care pericliteză viața, aşa cum este aspergiloza invazivă.

Din punct de vedere epidemiologic, infecțiille fungice pot fi:

– *endemice*, provocate de fungi *patogeni primari* (*Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces* (produc coccidioidomicoza, histoplasmoza, respectiv blastomicoza);
– *oportuniste,* provocate de fungii oportunişti (produc micoze superficiale şi profunde).

Majoritatea fungilor patogeni pentru om şi animalele superioare sunt agenți infecțioşi oportunişti exogeni, mediul lor de viață fiind apa, solul, resturile organice. Fungii invadează țesuturile organismelor cu potențial scăzut de apărare.

Infecția fungică a țesuturilor umane şi animale se produce pe fondul unor condiții locale favorizante. Din această cauză, transmiterea infecției de la un organism la altul este rară. În general, maladiile fungice nu sunt contagioase.

Pacienții care fac infecții fungice prezintă un set comun de factori de risc: imunosupresia, chimioterapia, malnutriția, malignitatea, neutropenia. Alți factori favorizanți: rănile produse de arsuri, cateterizarea. Administrarea agenților antimicrobieni cu spectru larg de acțiune creează condiții favorabile expansiunii fungilor în tractul digestiv, de unde colonizează tegumentul şi trec în sânge prin cateter venos. Altă cale de infecție este translocația patogenilor fungici din tractul gastro-intestinal, în sânge.

Din punct de vedere al localizării, *micozele* pot fi împărțite în următoarele categorii:

– infecții *sistemice* sau *profunde*, în care agentul patogen este larg diseminat în organism şi creşte în diferite organe şi țesuturi;
– micozele *intermediare* sunt considerate acelea care produc leziuni epidermice, subcutanate, ale mucoaselor sau ale țesutului pulmonar. Infecția este inițiată prin inhalarea sporilor, prin contaminarea rănilor sau prin ingestie şi se poate extinde dincolo de localizarea primară, în alte țesuturi, la diferite profunzimi. Cele mai tipice infecții intermediare sunt *candidoza, aspergiloza, mucormicoza, pneumocistoza*;

– micozele *superficiale* includ infecții tegumentare și ale fanerelor (păr, unghii). Fungii care produc infecții superficiale se numesc *dermatomicete*.

Clasificarea tipurilor de infecții are numeroase suprapuneri, deoarece micozele sistemice au manifestări cutanate și invers. Unii fungi produc numai un tip de infecție, iar altele produc toate cele 3 tipuri de infecție.

Infecțiile fungice apar frecvent, ca o consecință a eliminării microbiotei normale, prin terapie orală cu antibiotice. Micozele cu cea mai mare frecvență sunt *candidoza* și *dermatomicoza*, produse de fungi din microbiota normală. Câțiva fungi (*Cryptococcus neoformans, Coccidioides imitis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitides*) produc infecții pulmonare foarte asemănătoare cu tuberculoza prin manifestările clinice.

Persoanele care fac infecții fungice oportuniste au maladii de fond sau sunt imunocompromise.

Fungii patogeni nu produc toxine potente. Mecanismele patogenității sunt poligenice.

Grupul fungilor patogeni nu include *fungii alergici* și pe cei care *eliberează micotoxine* în substratul în care cresc. Aceste două categorii nu intră în grupul fungilor patogeni, pentru că nu produc maladii în sensul strict, adică nu sunt contagioși.

Capacitatea fungilor de a sintetiza toxine este variabilă în funcție de substratul pe care se dezvoltă. Sinteza toxinelor este asociată, în primul rând, cu sporogeneza.

Nu toți fungii produc micotoxine. Prezența organismelor competitive pare să fie importantă, deoarece microfungii cultivați în cultură pură în laborator, pierd potențialul toxic.

Pentru majoritatea fungilor patogeni nu se cunosc stadii de înmulțire sexuată și de aceea poziția lor sistematică este incertă.

Factorii de virulență ai fungilor sunt multipli și sunt reprezentați de structurile sau de particularitățile fizologice care creează un avantaj agentului infecțios în interacțiunea cu organismul gazdă:

– capacitatea de a crește la 37° și la pH fiziologic, pentru fungii care invadează țesuturile profunde;
– tranziția la forma parazitară este esențială pentru patogenitatea fungilor dimorfici. Unii fungi sunt patogeni sub formă de levură sau conidială (*Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis*), iar alții trebuie să se comute la creșterea hifală pentru a-și exprima patogenitatea. Dimorfismul este controlat de sursa de N, pH, temperatură și de factori interni ai parazitului;
– capacitatea de a sintetiza enzime degradative (elastaza, alte proteaze);
– sinteza materialului capsular cu rol protector, antifagocitar (*Criptococcus neoformans*);
– sinteza factorilor de aderență la celulele gazdei;
– sinteza pigmentului melanină, catalizată de fenol-oxidază, o enzimă care distruge radicalii intermediari ai reducerii O_2 și $^1O_2$. Sinteza melaninei a evoluat ca un factor protector față de UV și de radiația ionizantă;
– sinteza toxinelor la *Cochliobolus*, un fung patogen pentru plante;
– în interacțiunea cu planta gazdă, patogenul fungic poate să producă o substanță care detoxifică compușii antifungici eliberați de sistemul radicular

28.3. Fungi patogeni pentru om

28.3.1. Dermatomicetele reprezintă un grup de fungi strâns înrudiți, care au capacitatea de a invada țesuturile keratinizate (piele, păr și unghii), la nivelul straturilor cornificate moarte, umane și animale, producând micoze superficiale (cutanate) numite *dermatomicoze*.

28.3.1.1. Micozele cutanate sunt produse de fungii grupului *dermatomicete* care au capacitatea de a infecta țesuturile keratinizate superficiale (epiderma, părul, unghiile). Cele circa 40 de specii sunt înrudite și aparțin genurilor *Microsporum, Trichophyton* și *Epidermophyton* (formele anamorfe, asexuate sau imperfecte) (Brooks, 2007). Procesul infecțios este limitat la stratul cornos superficial al epidermei, fapt explicabil prin aceea că *in vitro*, agenții infecțioși nu cresc la 37° și nici în prezența serului. Sunt cele mai frecvente dermatomicoze. Infecțiile sunt persistente, dar nu

periclitează viața. Speciile de dermatomicete capabile de reproducere sexuată aparțin genului *Arthroderma* (Weitzman și col. 1986), familia *Arthrodermataceae*, ordinul *Onygenales*.

Dermatomicetele recunoscute în prezent și speciile nepatogene (tabelul 70) se disting de alte specii de fungi prin faptul că prezintă o rezistență înaltă la cicloheximidă și au capacitatea de a utiliza *proteinele* ca unică sursă de carbon, eliberând ioni de amoniu în exces care determină alcalinizarea mediului.

Tabelul 70.

Dermatomicetele și speciile înrudite nepatogene, formele teleomorfe și anamorfe.

Forma teleomorfă	*Forma anamorfă*
Arthroderma sp.	*Microsporum* și *Tricophyton*
A. benhamiae	T. mentagrophytes
A. cajetani	*M. cookei*
A. fulvum	*M. fulvum*
A. grubyi	*M. vanbreuseghemii*
A. gypseum	*M. gypseum*
A. incurvatum	*M. gypseum*
A. otae	*M. canis*
A. obtusum	*M. nanum*
A. persicolor	*M. persicolor*
A. racemosum	*M. racemosum*
A. simii	*T. simii*
A. vanbreuseghemii	*T. mentagrophytes*

În funcție de *habitatul* obișnuit, dermatomicetele se clasifică în *geofile* (în sol), *zoofile* (la animale) și *antropofile* (la om) (tabelul 71). Speciile antropofile produc cel mai mare număr de micoze persistente la om, greu de vindecat. Cele geofile și zoofile sunt mai puțin adaptate la existența în țesuturile umane, produc procese inflamatorii mai ample și sunt eliminate mai ușor.

Tabelul 71.

Ecologia speciilor comune de dermatomicete.

Specia	Habitatul natural	Incidența infecției
Epidermophyton floccosum	Om	Crescută
Trichophyton rubrum	Om	Crescută
Trichophyton interdigitale	Om	Crescută
Trichophyton tonsurans	Om	Medie
Trichophyton violaceum	Om	Medie
Trichophyton concentricum	Om	Redusă
Trichophyton schoenleinii	Om	Redusă
Trichophyton soudanense	Om	Redusă
Microsporum audouinii	Om	Medie
Microsporum ferrugineum	Om	Medie
Trichophyton mentagrophytes	Șoarece, rozătoare	Medie
Trichophyton equinum	Cal	Redusă
Trichophyton erinacei	Arici	Redusă
Trichophyton verrucosum	Vite	Redusă
Microsporum canis	Pisică	Medie
Microsporum gypseum	Sol	Medie
Microsporum nanum	Sol/porc	Redusă
Microsporum cookei	Sol	Redusă

Speciile geofile sunt considerate strămoșii speciilor patogene de dermatomicete. Habitatul acestor specii este *solul*, fiind asociate cu materialele keratinizate în descompunere (păr, pene, coarne, copite, unghii etc.). Contactul direct cu solul este principala sursă de infecție a omului și a animalelor. Transmiterea speciilor geofile de la animale la om sau de la om la om este rară. Unul dintre cele mai bune exemple de dermatomicete geofile este *Microsporum gypseum*, agentul etiologic a două afecțiuni neobișnuite asociate cu solul. Una dintre acestea apare la muncitorii din sere, care lucrează cu sol fertilizat. Cea de a doua infecție apare la copiii și adulții care intră în contact cu muncitorii infectați din sere.

Speciile zoofile au evoluat din speciile geofile şi au pierdut capacitatea de a supravieţui timp îndelungat în sol. În mod obişnuit, speciile zoofile sunt asociate cu o anumită gazdă sau un număr limitat de gazde, în afara cărora se găsesc în cazuri excepţionale. Dermatomicetele zoofile cresc rareori ca saprobionte, dar supravieţuiesc în stare latentă în materialele de origine animală. Infecţiile umane sunt rezultatul, fie al unui contact direct cu animalul infectat, fie al unuia indirect, cu materiale aparţinând animalelor infectate. *Microsporum canis, Trichophyton verrucosum* şi *T. mentagrophytes* produc impetigo la animale, dar frecvent sunt asociate cu infecţii umane. *M. canis* infectează animalele domestice, în special pisica, câinele şi calul, care diseminează conidiile infecţioase în mediul încojurător, producând astfel infecţiile familiale. Copiii cu vârste între 5–14 ani sunt mult mai sensibili decât adulţii. Infecţiile omului cu *M. canis*, provin de la câine şi de la pisică.

Evoluţia de la viaţa saprobiontă din sol, la colonizarea ţesuturilor umane se corelează cu descreşterea sau chiar cu pierderea capacităţii de a forma conidii şi de a se reproduce sexuat. Pierderea reproducerii sexuate se observă la aproape toate dermatomicetele antropofile, cu toate că un număr mic de membri ai complexului *Trichophyton mentagrophytes* (izolatele de *T. interdigitale*), păstrează această cale de reproducere (*Arthroderma benhamiae* sau *A. vanbreuseghemii*).

Scăderea sau pierderea capacităţii de a forma conidii şi a capacităţii de a se reproduce sexuat, este corelată cu faptul că speciile antropofile de dermatomicete tind să producă infecţii cronice, care nu se vindecă spontan. Formarea macroconidiilor caracteristice, *in vitro*, în mediul de creştere, oferă dovada existenţei saprobionte, deoarece conidiile nu se formează în gazdele infectate.

Diagnosticul se pune prin examinarea microscopică a firelor de păr, a raclajului tegumentar de la periferia leziunii şi a unghiilor, unde se observă creşterea hifală şi lanţuri de conidii. Proba de raclaj tegumentar se recoltează de la periferia leziunii, deoarece procesul infecţios-lezional progresează centrifug.

Proba se examinează pe lamă, în picătură de soluţie 10–28% de KOH, cu sau fără calcofluor, un colorant specific al peretelui celular fungic. Preparatul se examinează la microscopul cu fluorescenţă. În raclajul tegumentar şi al unghiei se observă hife ramificate şi lanţuri de conidii. *Microsporum* formează teci de spori în jurul firului de păr.

Identificarea morfologică a dermatomicetelor urmează în prezent schema lui Emmons, care se bazează în special pe caracterele microscopice ale anamorfelor şi pe morfologia coloniilor crescute pe mediul Sabouraud, cu cicloheximidă şi cloramfenicol, după incubarea la 25° timp de 2 săptămâni. Pentru stimularea formării conidiilor este necesară adăugarea extractului de levuri 1%, sau folosirea unor medii cu cartof sau făină de porumb.

Se examinează atât culoarea aversului coloniilor, cât şi a reversului, prezenţa pigmentului difuzibil, textura suprafeţei şi rata de creştere. Foarte importante pentru identificare sunt tipul de conidii, forma, mărimea şi aranjamentul acestora, ca şi prezenţa altor structuri, ca de pildă hife pectinate, încolăcite şi în formă de corn de cerb, a clamidosporilor şi organelor nodulare.

Numeroase dermatomicete, în special cele asociate cu alte gazde, produc de regulă două tipuri de conidii: *macroconidii multicelulare* şi *microconidii unicelulare*. Tipul conidial şi textura suprafeţei macroconidiilor (rugoase sau netede) prezintă importanţă taxonomică.

Speciile de *Trichophyton* formează colonii albe sau crem, cu marginile netede şi reversul pigmentat în galben brun sau roşu brun, macroconidii cilindrice cu suprafaţă netedă şi microconidii caracteristice.

Epidermophyton produce pe agar Sabouraud colonii cu creştere lentă, gri-maronii, sau verde închis, cu marginile netede, cu pigment galben-*maroniu* pe revers. Coloniile vechi sunt albe. Textura este fină, catifelată. Macroconidiile cu perete subţire, netede, sunt alungite şi adesea grupate în clusteri, care cresc direct pe hife (fig. 460). Microconidiile sunt absente (Rebell şi Taplin, 1970, Rippon, 1988). Omul este gazda principală pentru *E. floccosum,* singura specie patogenă, determinând infecţii la om. Atacă tegumentul, unghiile şi foarte rar părul. Este specia cea mai comună şi produce *tinea pedis, tinea cruris* şi ocazional *tinea unguium,* dar nu invadează firul de păr. Cea de a doua specie, *Epidermophyton stockdaleae*, nepatogenă, este rezidentă în sol.

Majoritatea speciilor de *Microsporum* sunt larg răspândite, puţine fiind cele care au o distribuţie geografică limitată. Unele specii de *Microsporum* pot fi izolate atât din sol, cât şi de la animale (specii geofile şi zoofile) (tabelul 72).

Fig. 460. Epidermophyton floccosum. Aspectul coloniei pe mediu Sabouraud cu dextroză. Macroconidii alungite, care cresc direct de pe hife şi clamidiospori sferici, prezenţi în cutura îmbătrânită (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Speciile acestui gen produc *macroconidii, microconidii* şi *clamidospori.*

Macroconidiile sunt hialine, multiseptate şi variază ca formă, de la obovate la cilindro-fusiforme; pot avea pereţii groşi sau subţiri şi între 1–15 septe în funcţie de specie. Caracteristica distinctivă esenţială este că *macroconidiile* prezintă pereţii rugoşi sau echinulaţi. Dimensiunile variază de la 7–20 µm până la 30–160 µm. Macroconidiile şi asperităţile caracteristice ale suprafeţei se formează pe medii speciale. Forma lor, dimensiunile şi caracteristicile peretelui celular sunt importante pentru identificarea speciilor.

Tabelul 72.

Habitatul natural al speciilor de *Microsporum*.

Nr. crt.	Specia	Habiatatul/ Rezervorul natural
1.	*Microsporum audouinii*	Antropofil
2.	*Microsporum canis*	Zoofil (câini, pisici)
3.	*Microsporum cookei*	Geofil; izolat şi din blana câinilor, pisicilor, rozătoarelor
4.	*Microsporum ferrugineum*	Antropofil
5.	*Microsporum gallinae*	Zoofil
6.	*Microsporum gypseum*	Geofil; izolat şi din blana rozătoarelor
7.	*Microsporum nanum*	Geofil şi zoofil (porc)
8.	*Microsporum persicolor*	Zoofil (şoarece de câmp)

Microconidiile sunt de regulă hialine, unicelulare, piriforme până la clavate, cu pereţii netezi, de 2,5 –3,5 µm până la 7µm şi nu au valoare de diagnostic.

La microscop se examinează atât structura, cât şi aranjamentul ambelor tipuri de conidii.

Membrii acestui gen, de regulă, atacă pielea şi părul şi numai ocazional unghiile.

Gruby a descoperit invazia ectotrihă a părului scalpului şi a celui din barbă a unor pacienţi, agentul etiologic fiind denumit *Microsporum audouinii.*

Separarea acestui gen de *Trichophyton* se bazează pe faptul că macroconidiile au pereţii rugoşi, cu toate că acest caracter este greu de observat.

Au fost descrise 17 specii de *Microsporum*, cele mai importante fiind *M. audouinii, M. canis, M. cookei, M. distortum, M. ferrugineum, M. gallinae, M. gypseum, M. vanbreuseghemii* (tabelul 73).

Tabelul 73.

Caracteristicile speciilor patogene de *Microsporum* în cultură.

Nr. crt.	Specia	Caractere macroscopice ale coloniei/ mediu Sabouraud	Caractere microscopice	
1.	*Microsporum audouinii*	Suprafaţa albă, gri sau cafenie-roşiatică, plană sau catifelată; reversul ruginiu; creştere moderată.	Macroconidii fusiforme, alungite, pereţi groşi rugoşi, septuri dispuse neregulat, microconidii clavate, formate de-a lungul hifelor, hife pectinate, clamidospori terminali sau intercalari. Microconidii rare, măciucate	Nu perforează firul de păr *in vitro.* Colorație maronie pe mediu cu orez şi creştere săracă.
2.	*Microsporum canis (M. canis var. distortum)*	Suprafaţa albă, pufoasă, lânoasă; reversul galben, portocaliu până la maroniu; fără pigment; creştere rapidă.	Numeroase macroconidii, fusiforme cu pereţii groşi, rugoşi, 18–125 x 5–27µm, mai mult de 15 septuri, protuberanţă la vârf, câteva microconidii în formă de măciucă frecvente. *M. canis var. distortum* macroconidii deformate cu pereţii groşi, rugoşi.	Sporulează greu pe mediu cu orez; perforează firul de păr *in vitro.*
3.	*Microsporum cookei*	Suprafaţa galbenă, cafenie-roşiatică sau, pulverulentă sau granulară; reversul roşu; creştere moderată.	Numeroase macroconidii, elipsoidale, cu pereţii groşi; unele cu pereţii moderat subţiri, asemănător cu *M. gypseum*; microconidii abundente.	
4.	*Microsporum ferrugineum*	Suprafaţa galbenă până la ruginie, pliată, de consistenţa cerii; creştere foarte lentă.	Hife neregulate, cu septe proeminente (aspect de tulpină de bambus), lipsite de conidii.	Nu perforează firul de păr *in vitro.*
5.	*Microsporum gallinae*	Suprafaţa albă până la roz deschis, uşor pliată; reversul roşu deschis, pigment difuzibil; creştere rapidă.	Macroconidii alungite, curbate, cu marginile tocite, netede cu uşoare asperităţi la margini; între 2–10 celule, cu 6–8 x 15–20µm; Microconidii prezente.	Pigment roşu difuzibil caracteristic; nu perforează firul de păr *in vitro.*
6.	*Microsporum gypseum* (fig. 461) *Microsporum fulvum*	Suprafaţa cafenie-roşiatică, pulverulentă; reversul maroniu-roşcat; creştere rapidă.	Macroconidii numeroase elipsoidale până la fusiforme, 25–60 x 7–15µm, pereţi rugoşi subţiri, mai mult de 6 septuri; microconidii abundente.	
7.	*Microsporum nanum*	Suprafaţa crem până la cafenie-roşiatică, pulverulentă; reversul maro-roşiatic; creştere moderată.	Macroconidii abundente ovoide sau în formă de ou, cu 1–3 celule; 10–30 x 6 x 13µm; microconidii rare sau moderate.	
8.	*Microsporum persicolor*	Suprafaţa galbenă aurie, prăfoasă sau pufoasă; reversul roz până la roşcat-maroniu.	Microconidii sferice abundente; aglomerări în mod obişnuit, clavate până la formă de pară; macroconidii clavate, netede, cu pereţii subţiri, pereţii rugoşi cu vârsta sau pe medii speciale; adesea sunt prezente hife în formă de spirală.	

BC IASI - CENTRALA UNIVERSITARA

9.	*Microsporum praecox*	Suprafața galbenă, prăfoasă până la pufoasă; reversul galben pal până la portocaliu; creștere moderată.	Macroconidii numeroase lungi, fusiforme, 40–90 x 7 x17 µm, macroconidii mici, netede sau spinoase, 2–8 septe; microconidii absente.	
10.	*Microsporum racemosum*	Suprafața bej-crem, granulară; plană; reversul roșu aprins; creștere rapidă.	Macroconidii numeroase, fusiforme, elipsoidale, 41–77 x 9–10 µm; se aseamănă cu M. gypseum; microconidii pedunculate numeroase, în aglomerări asemănător unui strugure (racem).	Perforează firul de păr *in vitro*. Rareori patogen.
11.	*Microsporum vanbreuseghemii*	Suprafața galbenă, crem sau roz; prăfoasă până la pufoasă; reversul galben pal.	Numeroase macroconidii cilindro-fusiforme, 44–87 x 11µm; până la 12 septe, pereți groși netezi până la spinoși; numeroase microconidii.	Perforează firul de păr *in vitro*. Rareori patogen.

Fig. 461. Microsporum gypseum- aspectul coloniei pe mediu Sabouraud cu dextroză, macroconidii alungite, microconidii piriforme (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Genul ***Trichophyton*** cuprinde peste 20 de specii de dermatomicete antropofile, zoofile și geofile, cele mai comune fiind *Trichophyton mentagrophytes, T. schoenleinii, T. rubrum, T. tonsurans, T. verrucosum* și *T. violaceum.*

Pentru diferențierea și identificarea speciilor de *Trichophyton* se folosesc numeroase caractere morfologice și fiziologice. Reprezentanții genului sunt lipsiți de stadiul sexuat, fiind astfel incluși în *Fungi Imperfecti.*

Morfologie. Rata de creștere a coloniilor de *Trichophyton* este lentă până la moderată. Textura este ceroasă, glabră până la pufoasă. Aversul este alb spre galben-bej sau roșu violet. Reversul este pal, galben, maro sau maro-roșiatic (tabelul 74). Este parazit pe pielea omului și a animalelor, dar poate fi izolat și din sol.

La nivel microscopic, prezintă o gamă largă de elemente structurale: macroconidii cu perete neted, microconidii și artroconidii, hife septate, hialine, hife spiralate, hife asemănătoare tulpinii de bambus, hife pectinate, hife în formă de coarne de cerb (candelabre favice), celule hifale „în rachetă", organe nodulare. Microconidiile, mult mai numeroase decât macroconidiile, sunt uniceluare, având formă sferică sau piriformă. Sunt numeroase, solitare sau grupate, sesile sau cu pedunculi scurți. Microconidiile sunt adesea tipul predominant de conidii produs de genul *Trichophyton.*

Macroconidiile sunt multicelulare, multiseptate, având două sau mai multe celule, cu pereții netezi, groși sau subțiri, prezentând formă cilindică, clavată, de creion sau de țigară. Acestea, de obicei, sunt produse într-un număr redus. Unele specii pot fi sterile, fiind necesare medii speciale pentru a le induce sporularea.

Modul de aranjare pe hifele fertile reprezintă unul dintre cele mai importante criterii de identificare.

Genul Trichophyton cuprinde specii antropofile, zoofile și geofile. Unele specii sunt cosmopolite, în timp ce altele au o distribuție geografică limitată. *Trichophyton* produce infecții ale părului, pielii și unghiilor la om. Majoritatea speciilor de *Trichophyton* prezintă forme *teleomorfe*, care sunt clasificate în genul *Arthroderma.*

Dintre speciile antropofile de *Trichophyton*, *T. rubrum* produce *tinea unguium, cruris și pedis*. *In vivo* această specie invadează foarte rar părul. Este răspândită global, infectează toate populațiile umane și a devenit mai frecventă în populațiile urbane, în special în țările dezvoltate, o dată cu folosirea încălțămintei acoperite, care menține căldura și umiditatea. În India, *T. rubrum* produce *tinea corporis* la femei și *tinea cruris* la bărbați; produce de asemenea infecții cronice.

T. mentagrophytes var. interdigitale, membru al complexului *T. mentagrophytes* (fig. 462) produce frecvent *tinea pedis* și *tinea cruris* și nu invadează părul *in vivo.*

Arthroderma simii (teleomorfa speciei *Trichophyton simii*), produce sporadic impetigo la câine, la maimuțe și la om în India.

Tabelul 74.

Caracteristicile celor mai comune specii patogene de *Trichophyton* în cultură.

Nr.crt	Specia	Caractere macroscopice ale coloniei pe mediu Sabouraud.	Caractere microscopice	Alte caractere.
1.	*Trichophyton concentricum*	Suprafaţa crem sau maro; încreţită, glabră sau catifelată; creştere foarte lentă.	Conidii absente, hife sterile, hife în formă de corn de cerb.	50% dintre izolate sunt stimulate de tiamină; distribuţie geografică limitată.
2.	*Trichophyton equinum*	Suprafaţa albă, pufoasă, în formă de cupolă; iniţial netedă, ulterior încreţită; reversul galben până la maroniu-roşiatic; creştere moderată.	Microconidii abundente, sferice, piriforme, alungite, formate de-a lungul hifelor, ocazional în mici aglomerări; macroconidii rare, clavate, cu pereţi netezi.	Necesită acid nicotinic; anumite izolate perforează firul de păr *in vitro*.
3.	*Tricophyton erinacei*	Suprafaţa albă, pudrată, plană; pigment galben pe revers; creştere rapidă.	Microconidii clavate, piriforme, de-a lungul hifelor, izolate sau aglomerate; macroconidii rare clavate, cilindrice, netede, cu pereţi subţiri.	Perforează firul de păr *in vitro*.
4.	*Trichophyton interdigitale* (subtipul antropofil	Suprafaţa albă-crem, pufoasă, reversul cafeniu-roşiatic;	Microconidii puţine, piriforme, de-a lungul hifelor.	
5.	*Trichophyton megninii*	Suprafaţa rozalie, catifelată; pliuri radiale; reversul roşu aprins, creştere moderată.	Microconidii abundente piriforme, macroconidii rare în formă de creion, netede.	.
6.	*Trichophyton mentagrophytes*	Suprafaţa crem, cafeniu-roşiatic până la roz; pudrată – granulară, plană; reversul roşu sau roşu-maroniu; creştere rapidă.	Microconidii sferice abundente în grămezi; macroconidii cu pereţii netezi, clavate, în formă de creion, hife spiralate adesea prezente.	Perforează firul de păr *in vitro*
7.	*Trichophyton rubrum*	Suprafaţa tipic albă, catifelată până la pufoasă, ocazional pudrată – granulară; reversul de culoarea vinului roşu, rar galbenă sau maro; pigment difuzibil; creştere moderată sau lentă.	Microconidii puţine/numeroase, piriforme; macroconidii rare în izolatele pufoase, numeroase, în formă de creion, clavate în coloniile granuloase, pudroase; 15–30 x 4–6 µm.	Testul de perforare a firului de păr *in vitro* negativ.
8.	*Trichophyton schoenleinii*	Suprafaţa glabră, ceroasă, cerebriformă devine catifelată, albă, gri sau cafeniu-roşiatic; creştere foarte lentă, sparge mediul.	Conidiile lipsesc în mod obişnuit; microconidii în culturile vechi catifelate; hife în formă de coarne de cerb; clamidospori şi hife cu umflături frecvente.	Creştere egală la 25°C şi 37°C, ceea ce îl diferenţiază de *T. verrucosum*.
9.	*Trichophyton simii*	Suprafaţa albă, crem, pudrată, granulară; reversul de culoarea paiului; creştere rapidă.	Macroconidii clavate, fusiforme, cilindrice, abundente, cu pereţii subţiri; clamidospori intercalari; microconidii piriforme, solitare, de-a lungul hifelor; pot fi prezente şi spirale.	Seamănă cu *T. mentagrophytes*, dar produce un număr neobişnuit de mare de macroconidii în izolatele cultivate de mai multe ori.
10.	*Trichophyton soudanense*	Suprafaţa plană, galbenă până la roşu mat, cu margini stelate în izolatele primare.	Macroconidii absente, puţine microconidii clavate,/absenţe; ramificaţii la nivelul hifelor.	Pot avea/nu nevoie de vitamine.
11.	*Trichophyton tonsuras*	Suprafaţa albă, crem, galben pal, maroniu-roşiatic, roz, pudrată, catifelată, plană sau ridicată şi încreţită; reversul maroniu-roşiatic; creştere lentă.	Microconidii numeroase, clavate, elongate, unele dilatări, variabile ca dimensiuni şi forme; macroconidii rare, cilindrice, netede, cu pereţii subţiri.	Creştere stimulată de tiamină; perforarea firului de păr este variabilă.
12.	*Trichophyton verrucosum*	Suprafaţa de culoare crem, maroniu-rosiatică, plană, catifelată, albă, glabră, pufoasă; creştere foarte slabă.	Conidii absente în mod normal; microconidii clavate; macroconidii neregulate; clamidospori caracteristici în lanţuri (şirag de perle).	Aproximativ 16% din izolate necesită tiamină şi inozitol; creştere stimulată la 37°C.
13.	*Trichophyton violaceum*	Suprafaţa de culoare violetă, glabră; creştere foarte lentă; pot aparea şi variante glabre albe.	Conidii tipic absente, excepţie cele cultivate pe medii îmbogăţite cu tiamină; hife neregulate şi clamidospori.	Creştrea şi sporularea sunt stimulate de tiamină.

Fig. 462. T. mentagrophytes. Aspectul coloniei pe mediu Sabouraud cu dextroză, macroconidii alungite, microconidii sferice şi hife spiralate caracteristice (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Infecţiile produse de dermatomicete – tinea, impetigo – sunt clasificate clinic pe baza localizării leziunilor pe suprafaţa corpului. Procesul infecţios poate să se dezvolte în diferite zone ale corpului şi este rezultatul inoculării locale. Dermatomicetele cresc centrifug, formând inele neregulate cu margini inflamatorii, cu unele zone clare în centrul leziunii. Denumirea de *impetigo* se bazează pe

aspectul leziunilor, asemănătoare unui vierme inelat, cu margini neregulate. Infecţiile sunt denumite după regiunea corpului, folosind termenul latin *tinea* (molie) şi după asemănarea efectului moliilor asupra hainelor de lână, cu leziunile dermatomicetelor pe piele. Manifestările clinice sunt clasificate astfel: *tinea pedis* (la nivelul piciorului) (fig. 463), *tinea cruris*, *tinea corporis* (pielea glabră), *tinea barbae* (la nivelul bărbiei şi al mustăţii), *tinea capitis* (scalp, sprâncene, gene), *tinea manum* (la nivelul mâinii), *tinea unguium* (la nivelul unghiilor) (fig. 464), *tinea favosa* (favus) şi *tinea imbricata* (impetigo determinată de *T. concentricum*). Tinea se transmite prin intermediul pielii descuamate de la nivelul piciorului, care poate ajunge pe covor.

Fig. 463. Tinea pedis – aspectul leziunilor (http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/athletesfoot.html). *Tinea unguium* (infecţia unghiilor) poate să fie consecutivă infecţiei prelungite cu *Tinea pedis*.

Fig. 464. Tinea unguium – aspectul leziunilor. (http://supercurso.sld.cu/supercursos/plonearticlemultipage.2006–05–05.8777394061/tinea-unguium).

Infecţiile sunt dobândite prin contactul tegumentului lezat, cu solul sau cu organismele infectate (animale şi om). Fungii antropofili se pot transmite direct cu obiectele contaminate (îmbrăcăminte). Sensibilitatea gazdei la infecţie creşte în condiţii de umiditate, căldură, factori chimici specifici ai tegumentului (compoziţia sebumului şi perspiraţia), vârsta tânără, predispoziţia genetică. Micozele cutanate poartă denumirea clinică de *tinea*, cu diferite localizări.

Tinea pedis (piciorul de atlet) este cea mai frecventă dermatomicoză, localizată în tegumentul degetelor şi al tălpii piciorului. Se manifestă prin prurit intens şi apariţia unor vezicule mici care se sparg şi eliberează un lichid limpede, neinfiltrat cu leucocite. Straturile cornoase ale epidermei se macerează şi astfel sunt expuse straturile bazale, unde se pot iniţia infecţii bacteriene. Agenţii etiologici cei mai comuni ai acestei forme de tinea, în infecţiile cronice sunt reprezentaţi de *Epidermophyton floccosum, T. interdigitale* şi *T. rubrum*.

Tinea corporis (fig. 465), *T. cruris* (cu localizare inguinală), *T. manum* cresc în straturile de celule keratinizate şi moarte ale epidermei. Sunt produse de *T. rubrum* şi *E. floccosum*. Leziunile sunt, de obicei, infecţii bilaterale, eritematoase şi solzoase, cu margini inflamate, adeseori cu erupţie veziculară. Metaboliţii, enzimele şi antigenele fungilor difuzează prin straturile viabile ale epidermei şi provoacă formarea veziculelor şi senzaţia intensă de prurit.

Fig. 465. Tinea corporis, manus, cruris, barbae – aspectul leziunilor. (http://supercurso.sld.cu/supercursos/plonearticlemultipage.2006–05–05.8777394061/tinea-corporis /tinea-cruris//tinea-barbae, Lam, 2008).

Tinea capitis (*Microsporum augouinii, M. canis, M. ferrugineum, M. gypseum. T. verrucosum* şi *T. megninii*) şi *T. barbae* (*T. mentagrophytes* şi *T. erinacei*) sunt dermatomicoze localizate în părul şi în epiderma scalpului şi respectiv, în zona bărbiei. Infecţia începe cu invazia stratului keratinizat al tegumentului şi progresează pe suprafaţa firului de păr. Infecţia este iniţiată chiar deasupra rădăcinii

părului şi progresează cu o rată egală cu rata creşterii firului de păr. Tipul de infecţie a firului de păr poate fi atât endotrih, cât şi ectotrih. În infecţia ectotrihă ((*Microsporum augouinii, M. canis, M. ferrugineum, M. gypseum. T. verrucosum* şi *T. megninii*), fungul infectează firul de păr la mijlocul foliculului formând astfel o teacă de hife şi artroconidii cu diametrul de 2–3μm, care înconjură firul de păr. Firul de păr infectat devine mai puţin viguros, fragil, rupându-se la nivelul scalpului şi dă impresia unei alopecii parţiale. În invazia endotrihă (*T. tonsurans, T. violaceum* şi *T. soudanens*), hifele invadează foliculul pilos, cresc în interiorul firului de păr, formează numeroase artroconidii şi deteriorează firul de păr. Firul de păr infectat devine alb-gri şi se rupe uşor de la nivelul scalpului. *Tinea capitis* poate astfel să genereze o manifestare clinică mai amplă – *tinea favosa /favus*, datorită inflamaţiei acute a foliculului pilos. Este o dermatomicoză rară, produsă de *T. schoenleini.* Procesul inflamator lezional produce cruste, numite "godeu favic" sau scutule. Infecţiile de durată pot duce la alopecie.

Tinea unguium (onicomicoza) este produsă de *T. rubrum, T. interdigitale* şi *E. floccosum.* Infecţia este localizată în patul unghiei şi părţile laterale ale unghiei.

Pityriasis (Tinea) versicolor (fig. 466) este o infecţie superficială a stratului cornos, cauzată de *Malassezia furfur complex*. Invazia pielii cornificate şi răspunsul gazdei sunt minime. Pe tegument apar macule hiper- sau hipopigmentate. *Malassezia* este o levură lipofilă şi necesită prezenţa lipidelor în mediul de creştere.

Fig. 466. Pityriasis (Tinea) versicolor. Aspectul clinic al leziunilor şi frotiu colorat Gram realizat din raclajul acestor leziuni, care evidenţiază hife scurte şi celule sferice caracteristice pentru *Malassezia furfur* (Ahmed, 2009; http://missinglink.ucsf.edu/lm/DermatologyGlossary/tinea_versicolor.html).

Infecţia se tratează cu soluţii keratolitice, cu acid salicilic sau cu compuşi azolici.

Tinea nigra (fig. 467) este o infecţie a stratului cornos al tegumentului, produsă de *Hortaea werneckii*, din grupul fungilor producători de melanină cu localizare parietală, ce conferă culoarea brună până la închisă, leziunilor tegumentare (Reid, 1998).

Examenul microscopic al raclajului tegumentar de la periferia leziunii relevă hife septate ramificate şi celule de levură în stadiul de înmugurire, cu perete melanizat.

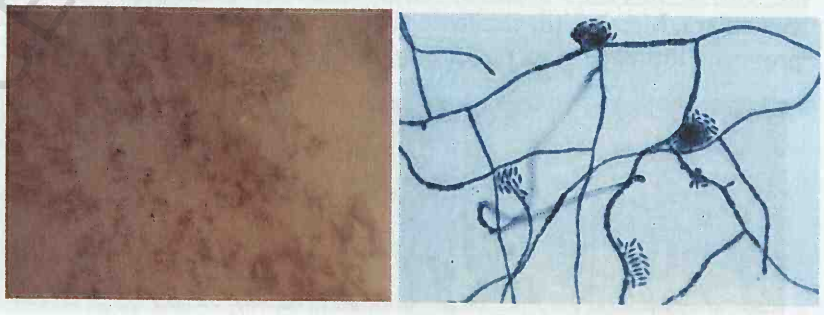


Fig. 467. Tinea nigra. În stânga, aspectul clinic al leziunilor. În dreapta, preparatul colorat cu albastru de brom timol din raclajul acestor leziuni ce evidenţiază hife lungi septate. Celulele levurice alungite, elipsoidale sunt denumite *Hortaea werneckii* (Xavier şi colab., 2008; http://phil.cdc.gov/ Public Health Image Library (PHIL)] -- image #3935).

Infecţia se tratează cu soluţie de sulfură de seleniu, aplicată zilnic. Compuşii azolici administraţi local sau oral sunt de asemenea eficienţi.

Trichophyton verrucosum produce *tinea* la vite, dar s-au raportat cazuri de infecţii produse la măgar, câine, capră, ovine şi cal. În anotimpul rece, când animalele sunt închise, incidenţa infecţiilor cu *Trichophyton verrucosum* creşte atât la om, cât şi la animale. Crescătorii de vite şi veterinarii suferă ocazional de tinea, produsă de *T. verrucosum.* Membrii complexului *T. mentagrophytes* (excepţie *T. mentagrophytes var. interdigitale*) sunt transmişi de rozătoare, iar incidenţa infecţiilor produse de

acest fung este mai mare în zonele rurale, în America de Nord şi Europa. *T. mentagrophytes* a fost izolat ocazional şi din sol, unde poate supravieţui până la câteva luni. Unii micologi consideră că *Microsporum persicolor* şi *T. simii* sunt specii geofile, în timp ce alţi autori le consideră ca fiind zoofile. Ambele specii au fost izolate în mod repetat din sol şi din firele de păr ale unor animale aparent sănătoase, purtătoare ale acestor fungi.

Infecţiile cutanate se tratează cu griseofulvină, itraconazol, miconazol, clotrimazol sau cu alţi agenţi antifungici cu aplicaţie locală.

Procesul infecţios în dermatomicoze este unic, având două caracteristici:

– ţesuturile vii nu sunt invadate, fiind colonizat numai stratul cornos keratinizat. Prezenţa fungului şi a produşilor metabolici induce o reacţie alergică şi inflamatorie a gazdei. Severitatea şi tipul răspunsului gazdei este legată adesea de specia şi tulpina de dermatomicete care a produs infecţia;

– dermatomicetele sunt singurii fungi care au căpătat dependenţă de infecţia gazdelor umane şi animale pentru supravieţuirea şi diseminarea speciei.

Factorii de virulenţă sunt reprezentaţi de proteinaze, keratinaze, elastaze. Activarea imunităţii mediate celular, corelată cu hipersensibilitatea întârziată şi cu răspunsul inflamator, au ca finalitate vindecarea clinică, în timp ce lipsa imunităţii celulare sau deficienţa imunităţii mediată celular predispune gazda la o *dermatomicoză cronică* sau *recurentă*. O asemenea infecţie este cunoscută sub denumirea de *tinea* sau *impetigo*, bube dulci, pecingine (ringworm). Infecţia unghiilor se numeşte *onicomicoză*. Dermatomicetele, în mod normal, nu invadează ţesuturile vii, dar colonizează alte straturi ale pielii. Ocazional invadează ţesuturile subcutanate, dezvoltând kerion.

Dermatomicetele cutanate secretă *trichofitina*, un amestec de proteine, care determină o stare de sensibilizare a gazdei şi pacientul devine hipersensibil. Preparatul brut de trichofitină, obţinut prin filtrarea mediului în care a crescut *Trichophyton,* poate fi administrat intradermic pentru detectarea reacţiei de hipersensibilitate imediată sau întârziată, care însoţeşte dermatomicoza, la unii dintre pacienţi. Cei cu infecţii cronice neinflamatorii au reacţie de hipersensibilitate întârziată şi imunitate mediată celular, de mică intensitate. Aceşti pacienţi sunt atopici, au manifestări de hipersensibilitate imediată şi nivel crescut de IgE. Dermatomicetele originare în sol (geofile) şi cele zoofile induc reacţii inflamatorii mai intense şi sunt mai iritante. Dermatomicetele geofile localizate în firul de păr stimulează o reacţie inflamatorie mai intensă, asemănătoare celei piogenice.

Majoritatea fungilor patogeni nu produc toxine, dar în schimb prezintă modificări fiziologice în timpul infecţiei – creşterea ratei metabolice, modificarea căilor metabolice şi modificarea structurii peretelui celular. Mulţi dintre fungii patogeni sunt termotoleranţi şi pot rezista sistemelor microbicide fagocitare. Fungii sunt capabili să reziste mecanismelor de apărare a gazdelor.

Speciile de dermatomicete aparţinând celor trei genuri (*Epidermophyton, Microsporum* şi *Trichophyton*) prezintă patogenitate diferită *in vivo*. Toate speciile celor 3 genuri invadează stratul cornos al epidermei şi foliculul pilos, dar diferă în ceea ce priveşte capacitatea lor de a invada părul şi unghiile. Specificitatea de ţesut poate fi legată de necesităţile nutriţionale sau de producerea de diferite enzime.

Studiile *in vitro* demonstrează faptul că anumite tulpini de *Microsporum* şi *Trichophyton* produc enzime capabile să solubilizeze keratina şi proteinele fibroase înrudite din piele, păr, gheare, copite. Keratina, elastina şi colagenul reprezintă mai mult de 25% din greutatea organismului mamiferelor. Enzimele proteolitice sintetizate de către fungi măresc capacitatea de supravieţuire în ţesuturi alterând micromediul prin digestia proteinelor gazdei, furnizând astfel resursele nutritive; variaţiile potenţialului enzimatic sunt responsabile de diferenţele potenţialului patogen al diferitelor tulpini.

Infecţiile cu dermatomicete sunt dobândite prin contactul tegumentului lezat, cu solul sau cu organismele infectate (animale şi om). Speciile geofile sunt transmise prin contact cu solul. Speciile zoofile sunt transmise de către animalul infectat, iar fungii antropofili sunt transmişi direct prin contactul tegumentar cu gazda infectată sau indirect cu pielea exfoliată infectată, părul din perii, haine sau cu obiecte contaminate. S-a remarcat existenţa unor purtători asimptomatici. Sunt infectate atât gazdele sănătoase, cât şi pacienţii imunocompromişi. Sensibilitatea gazdei la infecţie creşte în condiţii de umiditate, căldură, factori chimici specifici ai tegumentului (compoziţia sebumului şi perspiraţia), vârsta tânără, predispoziţia genetică şi când există o rană la nivelul pielii (cicatrici, arsuri). În funcţie de specie, aceste microorganisme pot supravieţui în mediu mai mult de 15 luni.

Vârsta este un factor important care condiționează sensibilitatea la infecție: *impetigo* al pielii capului este frecventă la copii și rară la adulți, iar *infecția interdigitală* este frecventă la adulți și rară la copii. Acizii grași nesaturați din secreția glandelor sebacee ale adultului au acțiune antifungică, ceea ce explică rezistența mai mare la infecțiile fungice superficiale. Una dintre substanțele antifungice din secreția glandelor sebacee, *acidul undecilenic*, se adaugă în compoziția multor unguente, folosite în controlul infecțiilor fungice ale pielii. Infecția interdigitală este favorizată de umiditatea locală crescută și este produsă de fungi din g. *Epidermophyton*.

28.3.1.2. *Micozele subcutanate* sunt produse de fungi al căror habitat este solul sau vegetația. Fungii infectează leziunile tegumentare sau sunt inoculate cu materialul contaminat prin traumatisme. Infecția țesutului conjunctiv dermic evoluează ca o leziune granulomatoasă și, din zona inițială, se extinde lent. Rareori, infecția subcutanată evoluează sistemic, pe fondul imunodepresiei.

Infecțiile sunt produse de *Sporothrix schenckii* (fig. 468), un fung dimorfic, în funcție de temperatura de creștere: la temperatura ambientală creșterea este filamentoasă, cu hife ramificate, septate și conidii, iar în țesuturi și la 35–37° crește ca levură care înmugurește. Sporotrichoza este o infecție granulomatoasă cronică, care afectează țesuturile cutanate, subcutanate și limfatice adiacente, caracterizată prin apariția unor leziuni nodulare, supurative și ulcerative.

Fig. 468. Sporothrix schenckii. Aspectul leziunilor, morfologia coloniilor și aspectul microscopic, cu hife lungi, ramificate și conidii sferice, formate pe conidiofori lungi (Takashi MOCHIZUKI – Pathogenic Fungi Database(PFDB), http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/).

Micetoma este o infecție cronică granulomatoasă, indusă de inocularea traumatică a câtorva specii saprobionte de fungi sau de bacterii actinomicete. Actinomicetele g. *Madura* din sol produc *actinomicetomul*. Micetomul produs de fungi este un *eumicetom*. Actinomicetomul este mai invaziv și se extinde din țesutul subcutanat de la locul infecției, spre țesutul muscular subiacent. Fungii care produc micetoma sunt specii ale genului *Madurella* (fig. 469), ce formează colonii caracteristice, ce produc un pigment brun difuzibil în mediu, iar la microscop se evidențiază fialidiile ce poartă conidii sferice sau conidiofori cu conidii piriforme (Chung și Benett, 2002).

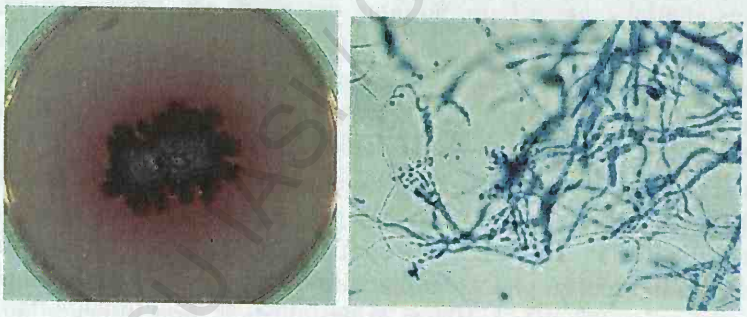


Fig. 469. Madurella mycetomatis. Morfologia coloniilor și aspectul microscopic, cu fialidii ce poartă conidii sferice (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Alte specii care cauzează dermatoficoze sunt: *Nattrassia mangiferae* (agent al onicomicozelor și infecțiilor cutanate superficiale, mai ales în zonele tropicale).

Hifomicetele sunt fungi filamentoși care produc colonii maron închis, verde închis sau negre și sunt agenți ai feohifomicozelor.

Alternaria (fig. 470), *Bipolaris, Exserohilum* produc infecţii cutanate (keratite micotice), feohifomicoze (infecţii subcutanate, sinuzită paranazală, osteomielită şi peritonită la pacienţi dializaţi).

Fig. 470. Alternaria. Cultură dezvoltată pe mediu lactozat (stg.) şi frotiu amprentă (Foto Elvira Borcan).

Cladophialophora bantiana produce abcese cerebrale şi infecţii subcutanate la pacienţi imundeprimaţi, iar *Cladophialophora carrionii* şi *Fonsecaea* produc cromoblastomicoza.

Curvularia lunata, C. pallescens şi *C. geniculata* produc sinuzite, endocardite, peritonite şi infecţii diseminate (McGinnis, 1980).

Exophiala jeanselmei, E. moniliae şi *E.spinifera* produc micetoame, infecţii localizate subcutanate, cutanate, endocardite, infecţii cerebrale şi sistemice (De Hoog şi Hermanides-Nijhof, 1977).

Scedosporium poate produce infecţii neinvazive ale urechii externe şi pulmonare sau invazive, posttraumatice, artrite, osteomielite, keratite micotice, sinuzite, meningite, abcese cerebrale, endoftalmite, la pacienţii imunodeprimaţi.

28.3.2. Micozele sistemice primare sunt produse de speciile a 4 genuri de fungi: *Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Paracoccidioides brasiliensis, Blastomyces dermatitidis.* Distribuţia este restrânsă la ariile endemice specifice. Distribuţia este restrânsă la ariile endemice specifice. Creşterea lor este dimorfică, dependentă de temperatură. *Coccidioides* şi *Histoplasma* sunt organisme rezidente în sol, iar pentru *Paracoccidioides* şi *Blastomyces*, habitatul nu este cunoscut.

Infecţiile sunt iniţiate în ţesutul pulmonar, după germinarea conidiilor inhalate. Marea majoritate a infecţiilor sunt subclinice, deoarece macrofagele alveolare fagocitează şi distrug agentul infecţios. Puţine infecţii evoluează clinic, la nivel pulmonar. Dintre acestea, rareori procesul infecţios patologic se extinde la alte organe. Cu rare excepţii, aceste infecţii micotice nu se transmit la alţi indivizi.

Procesul infecţios evoluează cu inflamaţie *granulomatoasă*, datorită persistenţei agentului patogen în macrofagele alveolare. Se sintetizează anticorpi şi se activează IMC. La persoanele imunocompetente, răspunsul IMC elimină reacţia inflamatorie, dar agentul infecţios persistă în stare latentă în macrofage şi reprezintă forma latentă a infecţiei cu potenţial de recurenţă. Persoanele imunocompromise prezintă un risc crescut de infecţie gravă.

H. capsulatum (denumirea vine de la faptul că pe preparatele colorate Giemsa şi Gram, peretele celular de *H. capsulatum* este impermeabil pentru coloranţi, celulele de levură pe secţiunile ţesutului infectat, aparând adeseori ca fiind înconjurate de un spaţiu incolor, interpretat incorect ca fiind o structură capsulară), un fung saprobiont din sol, dimorfic, produce *histoplasmoza*, cea mai frecventă infecţie micotică la om şi la animale. Stadiul sexuat se numeşte *Emmonsiella capsulata.* În sol este favorizată de substratul azotat alcalin de guano şi creşte sub formă filamentoasă, cu formarea de macro- şi microconidii. La temperatura corpului (37°C) se dezvoltă forma levurică.

Histoplasmoza este o infecţie iniţiată prin inhalarea conidiilor şi apare la indivizii umani în toate zonele geografice. Procesul infecţios stimulează sinteza anticorpilor şi răspunsul IMC. După infecţie, chiar asimptomatică, organismul gazdă se sensibilizează la *histoplasmină*, un amestec de polipeptide pe care *Histoplasma* le eliberează în mediul de creştere. Histoplasmina se obţine în formă brută, din filtratul culturii în mediul lichid.

Conidiile inhalate cresc sub formă de levură şi sunt fagocitate de macrofagele alveolare, în interiorul cărora se pot multiplica. Localizată în macrofage, *Histoplasma* se poate disemina în ficat, splină, ganglioni limfatici, unde reacţia inflamatorie iniţială devine *granulomatoasă* după activarea răspunsului IMC. Interleukinele secretate de limfocite activează macrofagele, care devin inhibitorii pentru creşterea intracelulară a levurilor (Griffith, 1995). Cea mai importantă caracteristică de virulenţă este capacitatea parazitului de a parazita macrofagele. Histoplasma se multiplică în interiorul fagosomului, cu o rată comparabilă cu cea din mediul de creştere în mediul lichid. Macrofagele

constituie un mediu optim de creştere şi de multiplicare, dar şi de diseminare a parazitului. Neutrofilele sunt, alături de macrofage, o nişă favorabilă creşterii *H. capsulatum*. Fagocitele parazitate eliberează molecule toxice: O_2^- (superoxid), H_2O_2, $^1O_2$, OH^-, dar parazitul neutralizează efectul moleculelor toxice prin sinteza catalazei. Se pare că lizosomii fuzionează cu vezicula de fagocitoză, dar parazitul modulează valoarea pH a fagosomului, menţinându-l la valoarea neutră, prin eliberarea NH_4^+, ca şi *M. tuberculosis* (Eisenberg şi colab., 1991). *H. capsulatum* pătrunde şi se multiplică în fagocitele neprofesioniste.

La indivizii imunocompetenţi, inhalarea agentului patogen într-o doză mare, declanşează histoplasmoza acută, o infecţie autolimitată, cu febră, frisoane, mialgie, dureri de cap, tuse uscată. Infecţia se cronicizează în special la bărbaţi şi devine latentă. Episoadele periodice se datorează reactivării focarelor de infecţie latentă. Histoplasmoza severă diseminată evoluează la un număr mic dintre cei infectaţi: la copii, la vârstnici, la imunosupresaţi sau la imunodeficienţi (pacienţii SIDA).

În timpul progresiei histoplasmozei pulmonare, titrul anticorpilor creşte şi scade în perioada de latenţă. Anticorpii se detectează prin metoda imunodifuziei.

Testul tegumentar la histoplasmină, pentru detectarea reacţiei de hipersensibilitate întârziată devine pozitiv curând după infecţie şi rămâne pozitiv pentru mai mulţi ani.

Epidemiile de histoplasmoză apar, surprinzător, în ariile în care histoplasmoza este endemică şi majoritatea indivizilor au IMC demonstrabiă la testul histoplasminei. Totuşi, unii inivizi, la infecţia secundară fac histoplasmoză în forma clinică gravă. Paradoxul este explicat prin numărul mare de conidii care invadează ţesutul pulmonar, dar este posibil ca infecţia secundară să fie iniţiată de variante antigenice distincte, faţă de care organismul nu are memorie imunitară. Se crede că în ariile endemice, particularităţile solului ar induce apariţia unor variante modificate genetic sau antigenic (Groppe şi colab., 1991).

Tranziţia morfologică de la stadiul micelian saprobiont (în sol), la faza de levură (parazită) este prima treaptă a patogenezei. *In vitro*, conversia este un proces de durată şi dependent de cultivarea la temperatura de creştere la 37°, dar *in vivo*, în prezenţa macrofagelor, procesul este relativ rapid, în 24–72 de ore. Trecerea de la morfologia hifală miceliană la cea de levură este obligatorie pentru patogeneză şi progresia la histoplasmoză. Tulpinile tratate *in vitro* cu acid p-cloromercuri-fenil-sulfonic nu produc histoplasmoză, ceea ce sugerează că tranziţia la morfologia de levură este dependentă şi de alţi factori, nu numai de cel termic.

Un alt factor cu rol major în tranziţia morfologică este cisteina, un factor nutritiv esenţial al fazei de levură.

Diagnosticul de laborator al histoplasmozei presupune analiza mai multor probe: spută, urină, raclajul leziunilor superficiale, aspiratul de măduvă osoasă, leucocite sanguine. Pe frotiurile colorate prin metode speciale (Gomori) sau Giemsa, în citoplasma macrofagelor se observă celule ovoide, mici, de levură (fig. 471, 472).

Fig. 471. Mcroconidii de *H. capsulatum* (http://phil.cdc.gov/phil_images/20030624/4/PHIL_4023_lores.jpg).

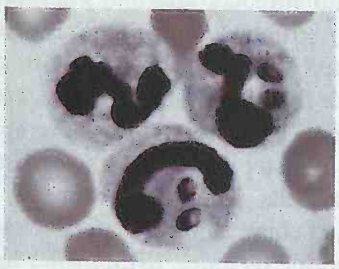


Fig. 472. Celule levurice de *Histoplasma capsulatum* în citoplasma neutrofilelor de câine (frotiu de sânge, colorație Wright-Leishman) (Edison şi colab., 2003).

H. capsulatum creşte pe medii complexe (glucoză, cisteină, sânge, agar) la 37° şi pe Sabouraud agarizat la 25–30°, după o incubaţie de 4 săptămâni (fig. 473).

Infecţiile uşoare se tratează cu itraconazol, iar histoplasmoza diseminată, cu amfotericină B.

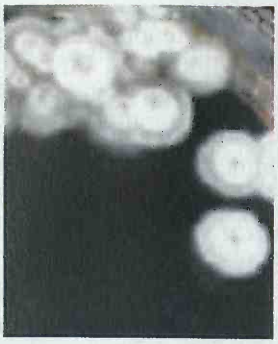


Fig. 473. Aspectul coloniilor de *Histoplasma capsulatum* pe mediu Sabouraud agarizat.

Fig. 474. Forma filamentoasă de *Blastomyces dermatitidis* (Tom Volk T, 2001).

Blastomyces dermatitidis este un fung cu creştere dimorfică, în funcţie de temperatură: la 25° creşterea este filamentoasă cu hife septate, ramificate şi cu conidii, iar la 37°, atât *in vivo* cât şi *in vitro* creşte sub formă de levură, cu celule mari, izolate, care înmuguresc (fig. 474).

Infecţia cu *B. dermatitidis* este iniţiată în plămâni, după inhalarea conidiilor. Probabil că marea majoritate a infecţiilor sunt subclinice. Infecţiile medii, cu infiltrat pulmonar, sunt supurative şi autolimitate. Din localizarea pulmonară, infecţia se poate disemina în oricare organ, dar mai frecvent în tegument şi în ţesutul osos. După diseminare, apar leziuni tegumentare supurative. Factorul de virulenţă pare a fi un fosfolipid legat covalent de glucan.

În mediul de creştere, *B. dermatitidis* eliberează un amestec de antigene, denumite *blastomicină*, lipsit de specificitate în testul tegumentar sau serologic.

B. dermatitidis produce infecţii, cu cea mai mare frecvenţă, la câine şi rareori infectează alte specii în ariile endemice. Infecţia nu este transmisă de animalele sau de persoanele infectate.
La om produce boala cronică granulomatoasă (CGD*). Netratată, infecţia are aproape totdeauna un sfârşit letal. Agentul terapeutic cu acţiune optimă este amfotericina B.

* CGD (boala cronică granulomatoasă) este datorată mutaţiei unei gene lincată pe cromosomul x, fiind cea mai cunoscută deficienţă a activităţii bactericide a neutrofilelor. Capacitatea de fagocitoză este normală, dar activitatea bactericidă faţă de agenţii care nu eliberează H_2O_2 (*S. aureus, Seratia marcescens*) este foarte mult diminuată. Fagocitele acestor pacienţi au un metabolism oxidativ deficitar, datorită unei defect al *oxidazei respiratorii,* ce constă în faptul că fagocitoza nu este urmată de intensificarea metabolismului oxidativ şi din această cauză nu se generează intermediarii reactivi ai reducerii O_2.

Efectul bactericid se menţine faţă de bacteriile care produc H_2O_2 (streptococi, lactobacili). La pacienţii CGD creşte incidenţa infecţiilor cu bacterii aerobe catalazo-pozitive, care inactivează H_2O_2 rezultată din propria lor activitate metabolică. Infecţiile cu bacterii, levuri (*Candida*), fungi filamentoşi (*Aspergillus*) sunt trenante şi însoţite de reacţii inflamatorii ample, care evoluează în granuloame, ca o reflectare a incapacităţii de a inactiva chemoatractanţii şi de a degrada antigenul. Deficienţa enzimatică esenţială este oxidaza care transferă electronii de la NADPH la O_2, pentru a forma anionul O_2^-.

Coccidioides immitis (fig. 475) este agentul coccidioidomicozei, o infecţie pulmonară, cauzată de inhalarea conidiilor. Dimensiunile mici ale sporilor de *C. neoformans* favorizează depunerea lor în alveolele pulmonare. Infecţia este iniţiată după inhalarea prafului contaminat cu artrospori. Sporii sunt fagocitaţi de macrofagele alveolare şi rezultă coccidioidomicoza primară, cu evoluţie variabilă, de la infecţia inaparentă până la pneumonia severă. Endosporii pot ajunge în circulaţia sistemică şi ulterior în diferite situsuri din organism (oase, articulaţii, ţesutul cutanat şi subcutanat), inclusiv în SNC, unde poate produce leziuni grave, cu formarea de abcese.

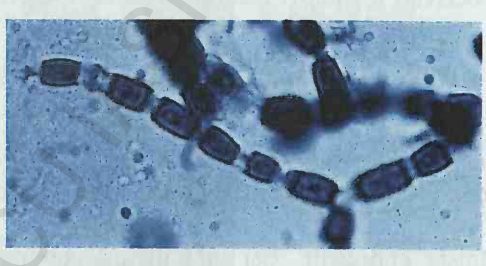


Fig. 475. Forma miceliană de *Coccidioides immitis,* cu conidii rectangulare formate din celule hifale, prin creşterea turgescenţei şi a rigidităţii peretelui celular (stânga) şi forma levurică, cu sferule ce conţin endospori, asemănătoare cu protozoarul *Coccidia,* vezi *Cococcidiodes* – asemănător cu *Coccidia* (dr.) (Volk, 2002).

Uneori pot apărea reacții alergice cutanate. Prezintă fenomenul de variație antigenică, prin care eludează mecanismele de apărare a gazdei. Pe frotiurile din țesutul infectat se observă structuri sferice (sferule), cu diametru de 15–60 μm, perete gros, pline cu peste 100 de endospori sferici, până la ovoizi.

Circa 5% din infecțiile severe evoluează sub forma plămânului cavernos cronic. Mai puțin de 1% din totalul infecțiilor pulmonare severe se disemineză pe cale hematogenă și inițiază formarea focarelor inflamatorii granulomatoase în tegument, oase, articulații, meninge.

Unul dintre factorii de virulență este *elastaza* (proteaza extracelulară). Fracția solubilă a peretelui conidial conține enzime cu rol de factori de virulență

Coccidioides este considerat fungul cu cea mai mare virulență, riscul mărit de infecție fiind asociat cu profesiile expuse la inhalarea prafului de sol (agricultori, arheologi, constructori). Se presupune că rasa neagră este mai sensibilă la infecție. Contaminarea solului este maximă în sezonul umed, în timp ce în sezonul uscat fungul supraviețuiește la adâncimea de 20 cm. Nu se cultivă în laborator datorită infecțiozității ridicate și faptului că artrosporii trec prin filtrele de 2 mm ale hotelor normale de laborator. Studii recente la nivel molecular au demonstrat existența a două specii: *Coccidioides immitis*, prezentă doar în California, și *Coccidioides posadasii*, după numele lui Alejandro Posadas, descoperitorul maladiei, izolată din alte regiuni ale globului (Fisher și colab., 2002).

Diagnosticul este foarte dificil și constă în evidențierea sferulelor pe frotiuri realizate din țesuturile ce prezintă leziuni. Coccidiomicoza sistemică se tratează cu amfotericină B sau cu azoli (ketoconazol sau itraconazol).

Blastomyces brasiliensis (Paracoccidioides brasiliensis) (fig. 476) este un fung dimorf, cu creștere filammentoasă la temepratura camerei și levurică la temperatura corpului. Conidiile sunt abundente și se formează la extremitatea conidioforilor.

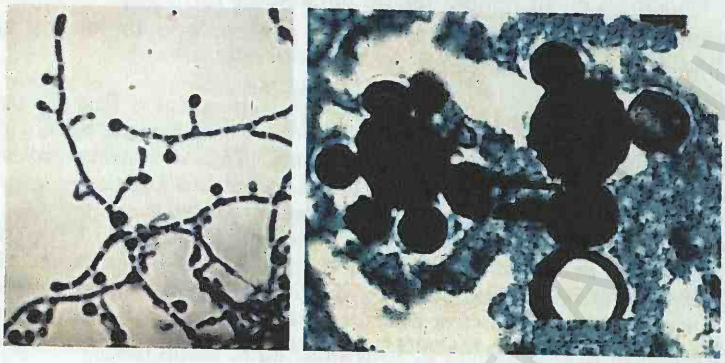


Fig. 476. Forma miceliană de *Paracoccidioides brasiliensis,* cu conidii formate la extremitatea hifelor (stânga) și forma levurică, cu înmugurire multiplă (dreapta) (Volk și Mossman, 2005).

Miceliul se dezvoltă lent pe mediul de cultură, după 20–30 de zile de incubare la temperatura camerei, formând colonii de culori și forme variate. Forma levurică apare după 5–10 zile de incubare la 37°C, iar la microscop se evidențiază înmugurirea multiplă a unei celule levurice, caracter diferențial pentru această specie.

Paracoccidioidomicoza este o boală cronică, granulomatoasă, progresivă localizată la nivelul plămânilor, mucoasei oronazale, cu afectare ganglionară, a suprarenalelor și a altor viscere. Infecția se transmite prin inhalarea aerosolilor contaminați sau prin implantarea traumatică a sporilor în organism.

Infecțiile cu *B. brasiliensis* se tratează cu derivați azolici (itraconazol), cu amfotericină B, cu sulfonamide.

28.3.3. Micoze oportuniste

Micozele oportuniste sunt produse de fungii ubicvitari în mediul extern sau componenți ai microbiotei normale, numai la persoanele imuno-compromise, dar persoanele normo-reactive sunt rezistente.

Candida și levurile înrudite sunt oportuniste endogene, dar alte micoze oportuniste sunt produse de fungi exogeni din sol, apă sau din aer.

Genul *Candida* cuprinde circa de 150 de specii de levuri ascosporogene, cu distribuție ubiquitară, cu specii saprobionte sau componente ale microbiotei normale a tractului digestiv, a tegumentelor și a mucoaselor la om. Colonizarea este timpurie, curând după naștere.

Dimorfismul speciei suscită un interes deosebit, deoarece formarea hifelor este considerată a fi un proces cu semnificație patologică, componentele de suprafață exprimate diferit la cele două forme, modulând aderența, invazia și consecutiv, relația gazdă-parazit. Diferențele în exprimarea antigenelor de suprafață, care se produc concomitent cu modificările morfologice la nivelul peretelui celular, au un efect de potențare a proprietăților de aderență la substrat și implicit a virulenței.

Micoza se localizează, în primul rând, la nivelul membranelor mucoase, dar și în piele sau plămân. Micozele mucoasei bucale a nou-născutului sunt comune, iar la adult, *Candida* produce procese patologice bucale, tonsilare și vaginale. Candidoza este o infecție a persoanelor imunocompromise.

În candidoze se pot observa celule levuriforme, pseudomicelii și tuburi germinative, greu de diferențiat de filamentele miceliene ale microfungilor dermatofite. În spută sau în abcesele subcutanate se pot evidenția elemente levuriforme (fig. 477). Aderența la substratul celular poate fi urmată de invazie hifală și pseudohifală cu tulpini virulente de *C. albicans*, în timp ce colonizarea cu specii mai puțin virulente poate fi limitată la straturile cheratinizate.

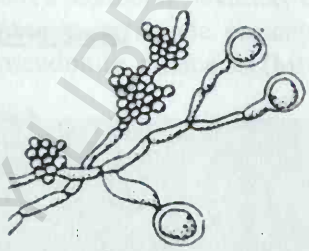


Fig. 477. Reprezentarea schematică a corpilor de fructificație la *C. albicans.*

Virulența și patogenitatea tulpinilor de *C. albicans* este condiționată de capacitatea acestora de a *adera* la suprafața celulelor gazdă, de a produce factori de virulență solubili implicați în progresia infecției (fosfolipaze, proteaze) și de proprietatea de *înmugurire* (formarea hifelor reprezintă un mecanism de evitare a mecanismelor de apărare a gazdei).

Colonizarea intestinului (organ important prin efectul său de barieră anti-infecțioasă exercitat de microbiota intestinală autohtonă) cu microorganisme exogene nu determină simptomele procesului infecțios, mai ales la gazdele imunocompetente (Andremont, 1992). Totuși, unele dintre microorganismele exogene sunt potențial patogene, în special pentru gazdele imunocompromise. Pentru a preveni colonizarea cu microorganisme exogene, o barieră eficientă trebuie să mențină populațiile de microorganisme endogene ale microbiotei normale la densități mici (barieră permisivă), mai ales a acelora care, deși totdeauna prezente în microbiota normală a subiecților sănătoși, pot deveni patogene dacă numărul lor crește excesiv. Un astfel de patogen oportunist este și *C. albicans.*

Efectul de barieră poate fi influențat de diferiți factori: dieta, stresul psihic, dar în special de tratamentele cu antibiotice cu spectru larg, care determină multiplicarea excesivă a microorganismelor rezistente și emergența celor potențial patogene. De la o stare de *eubioză* se ajunge la o stare de *disbioză* (Andremont, 1992). Pentru ca microbiota intestinală să-și exercite funcția de barieră este esențială păstrarea diversității, dar un tratament cu antibiotice, deși nu elimină complet microbiota, o simplifică și astfel, specii așa cum este *Candida,* a căror creștere în condiții obișnuite este supresată, devin capabile de colonizare.

Candida și levurile înrudite sunt oportuniste endogene, care produc infecții la persoanele imunocompromise, dar alte micoze oportuniste sunt produse de fungi exogeni din sol, apă, plante sau din aer, care invadează tractul respirator. Cele mai importante micoze oportuniste, în afară de candidoză, sunt aspergiloza, criptococoza, mucormicoza. Toate micozele oportuniste au un focar primar de infecție, de regulă în tractul respirator superior sau inferior. De aici, agentul patogen se diseminează pe cale sanguină sau limfatică, în alte organe.

Fig. 478. Micelii și celule levurice – frotiu din spută, colorație Gram (foto Elvira Borcan).

Candidoza este cea mai comună micoză sistemică, produsă de mai multe specii de *Candida* (*C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata* etc.). *C. albicans* este agentul patogen din grupul *fungilor imperfecti,* izolat cu cea mai mare frecvență din probele clinice (70% din totalul infecțiilor produse de *Candida*). Este agentul etiologic comun al infecțiilor severe ale mucoaselor, pielii și unghiilor. Spre deosebire de celelalte specii, *C. albicans* este dimorfică: produce nu numai pseudohife caracteristice levurilor, dar și hife adevărate. Pe mediul agarizat, pseudohifele cresc submers, în grosimea agarului.

C. albicans se distinge de alte specii de *Candida* prin teste morfologice: după incubarea în ser pentru circa 90 de minute, la 37°,

celulele de *C. albicans* încep să formeze hife adevărate cu tuburi de germinare, iar pe mediul cu deficit nutriţional produce spori mari sferici.

Candidoza superficială (cutanată şi a mucoaselor) este rezultatul creşterii numerice a celulelor de levură şi se exprimă prin leziuni ale tegumentului şi respectiv ale mucoaselor, ce permit invazia locală a levurii şi pseudohifelor.

După ce invadează torentul sanguin, dacă apărarea fagocitară a gazdei este inadecvată pentru a stopa creşterea levurii, infecţia cu *Candida* devine sistemică (fig. 479). Din torentul sanguin, *C. albicans* poate infecta rinichiul, se fixează pe valvele protetice ale inimii, infectează articulaţiile sau meningele.

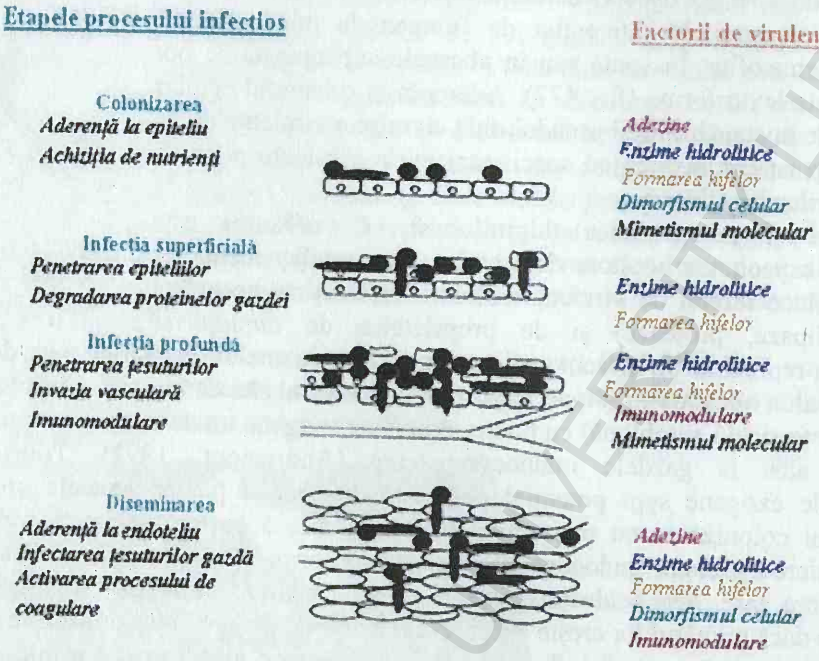


Fig. 479. Etapele procesului infecţios cu *Candida* şi factorii de virulenţă implicaţi în acest proces (după Naglik, 2003).

Pe secţiunile histologice, în ţesutul infectat se observă infiltratul leucocitar inflamator, cu formarea abcesului piogenic, iar în formele grave, granuloame cronice. Leziunile conţin un număr mare de celule levuriforme, care înmuguresc, cu formarea pseudohifelor.

Creşterea numărului celulelor de *Candida* în lumenul intestinal este consecinţa administrării antibioticelor orale. Din lumen, *Candida* poate să treacă în sânge.

Candidoza superficială apare la pacienţii SIDA, în timpul sarcinii, la diabetici, la copii, la vârstnici, la cei cu imunodeficienţă celulară sau la cei trataţi cu corticosteroizi şi la pacienţii CGD.

Creşterea agentului patogen pe mucoasa limbii, pe epiteliul gingival şi al palatului formează o pseudomembrană alburie zonală sau chiar confluentă, alcătuită din celule epiteliale, levuri şi pseudohife.

Candidozele orofaringiene sunt manifestări frecvente ale patologiei oportuniste la pacienţii SIDA, fiind prezente la 50% dintre indivizii seropozitivi şi la 90% dintre bolnavii de SIDA. Infecţiile oportuniste cu *Candida* sunt frecvente şi la alte categorii de pacienţi imunodeprimaţi, cum sunt cei leucemici şi cei cu neoplazie orofaringiană. Situsurile principale ale infecţiilor cu *Candida* sunt plămânul, epiteliul urinar şi tubul digestiv.

Invazia mucoasei vaginale produce *vulvo-vaginită*, cu iritaţie, prurit şi secreţie şi este precedată de diabet, ingestia medicamentelor antibacteriene ce alterează microbiota locală şi aciditatea locală.

Candidoza cutanată este consecinţa invaziei tegumentului traumatizat sau după arsuri. Infecţia axilară, inguinală, intergluteală şi inframamară, comună la diabetici şi la obezi, este favorizată de temperatură şi de umiditate. Ariile infectate devin eritematoase şi se pot forma vezicule.

Infecţia patului unghiei produce *onicomicoza*, cu edem dureros şi eritematos al unghiei, care poate să compromită vitalitatea ţesutului şi să distrugă unghia.

Candidoza sistemică este consecinţa introducerii cateterelor, intervenţiilor chirurgicale, abuzului de medicamente intravenoase, aspiraţiei medulare, leziunii tegumentare sau a mucoasei

tractului intestinal. La pacienții normo-reactivi, *Candida* este epurată din sânge. La persoanele cu deficit al funcției fagocitelor, la cele tratate cu corticosteroizi sau cu alți agenți imunosupresori, la cei cu boli ale sângelui (leucemii, limfom, anemie aplazică) sau cu CGD se dezvoltă leziuni în special în rinichi, inimă, meninge.

Diagnosticul. Probele de analiză sunt tampoane și raclaje din leziunile superficiale, sângele, LCR, biopsii tisulare, urina, exudatul, probe din cateterele intravenoase.

Probele se examinează pe preparate proaspete lamă /lamelă (în soluție 20% KOH) sau pe frotiuri care se colorează Gram pentru prezența pseudohifelor și a levurilor înmugurite sau May-Grünwald-Giemsa. Coloratia Gram este însă neadecvată pentru detectarea celulelor levurice de dimensiuni mici (*Candida glabrata).* La examenul microscopic se urmărește cu atenție prezența, forma și dimensiunile formațiunilor caracteristice levurilor: blastospori, pseudohife, filamente (hife) (fig. 480).

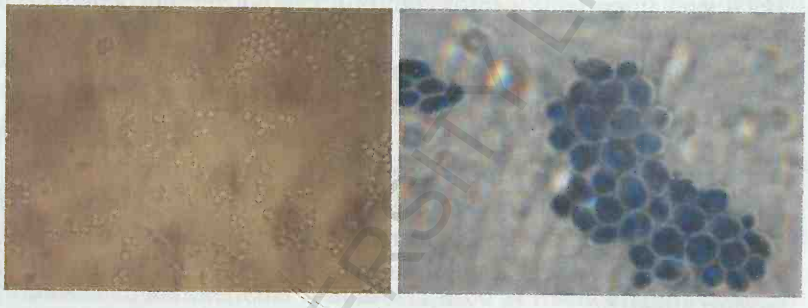


Fig. 480. Imagini sugestive pentru candidoza vaginală pe preparat proaspăt și respectiv, colorat cu albastru de metilen. Se observă blastospori (x100, x 400).

Toate probele se pot cultiva pe medii pentru fungi sau pentru bacterii, la temperatura camerei sau la 37°, identificarea până la nivel de specie putându-se realiza prin teste de tip API (fig. 481–483). Coloniile de levuri se examinează pentru prezența pseudohifelor.

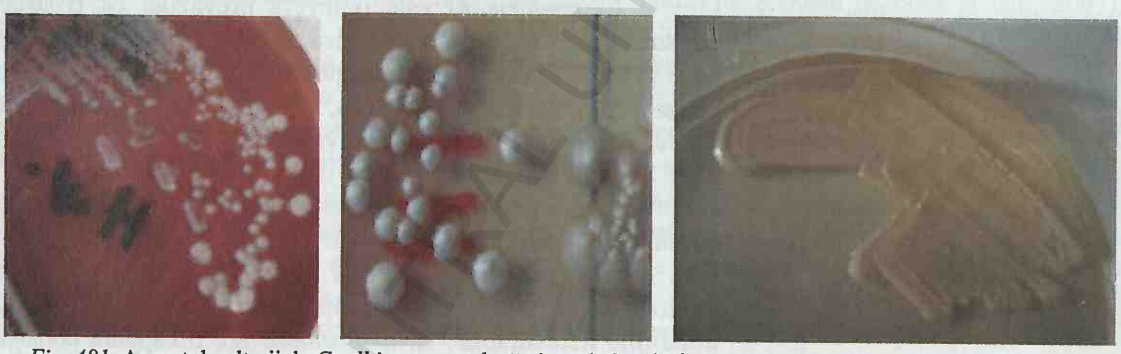


Fig. 481. Aspectul culturii de *C. albicans* pe geloză sânge (stânga) și pe mediu Müller Hinton (mijloc, dreapta).

Fig. 482. Levuri. Colorație cu albastru de metilen (x 1000).

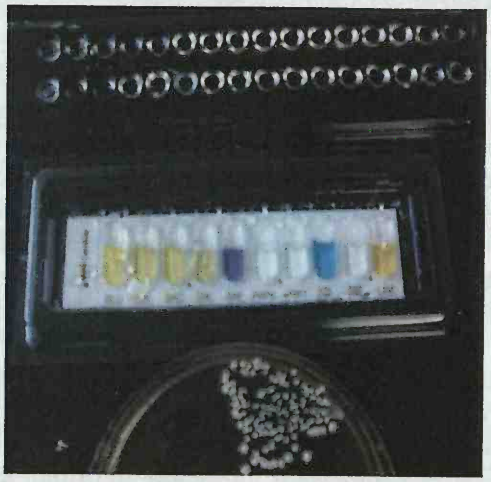


Fig. 483. Galerie Api pentru identificarea levurilor tip *Candida* (foto Elvira Borcan).

Culturile pozitive din situsuri sterile în mod normal au semnificație pentru diagnostic. Culturile pozitive din sânge denotă o candidoză sistemică sau o candidemie tranzitorie datorită contaminării normale. Culturile din spută nu au valoare de diagnostic, deoarece *Candida* face parte din microbiota normală. Cateterele contaminate pot da culturi fals pozitive ale urinii. Culturile din leziunile contaminate au valoare de diagnostic.

Infecția cu *Candida*, în special cea sistemică, stimulează sinteza anticorpilor și IMC. Testul serologic nu se folosește pentru diagnosticul infecției.

Detectarea *mananului* parietal prin testul latex aglutinării sau testul EIA este mult mai specifică, dar are utilitate limitată, deoarece, candidemia este tranzitorie chiar în infecția sistemică sau titrul antigenic atinge valori semnificative și detectabile numai în faza tardivă a infecției.

Rezistența la infecția cu *Candida* este conferită în primul rând de neutrofile, dar limfocitele TCD_4 sunt importante pentru controlul candidozei mucocutanate prin interleukinele stimulatoare ale IMH și IMC.

Infecțiile mucocutanate se tratează cu nistatin aplicat local sau cu ketoconazol ori fluconazol, administrate oral. Infecția sistemică se tratează cu amfotericina B.

Infecția poate fi prevenită prin evitarea perturbării echilibrului microbiotei normale.

Cryptococcus neoformans este o levură din clasa bazidiomicetelor, prevăzută cu structură capsulară. După inhalarea bazidiosporilor sau a celulelor uscate, *C. neoformans* produce *criptococoza*.

Toate speciile de *Cryptococcus* sunt capsulate și pozitive pentru testul ureazei. S-au identificat 5 serotipuri ale polizaharidului capsular (A, B, C, D și AD), un polimer neramificat de manoză, cu legături alfa-1,3.

C. neoformans produce criptococoza, o infecție rară, dar incidența crește foarte mult la persoanele cu deficit al IMC. Factorii majori de risc sunt imunodeficiența severă, limfopenia, terapia cu corticosteroizi, limfocitopenia idiopatică TCD_4.

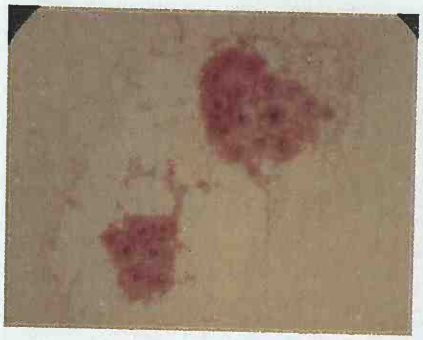


Fig. 484. Cryptococcus neoformans pe frotiu colorat Gram, din LCR prelevat de la un pacient SIDA cu meningoencefalită (foto Elvira Borcan).

C. neoformans este o levură prevăzută cu o structură capsulară de natură polizaharidică, cu o grosime de câțiva µm. Este singurul agent patogen fungic capsulat, capsula fiind formată dintr-un polizaharid vâscos, unicul component fiind glucuroxilomananul. Celule individuale au 3–5 µm. Se cultivă pe agar Sabouraud, la 30–35°, cu o perioadă de incubație de 3–4 zile. Tulpinile capsulate (fig. 484) nu sunt fagocitate, deoarece suprafața capsulei este chimiotactic negativă pentru fagocite, iar cele necapsulate sunt mult mai puțin virulente. Capsula nu a evoluat ca un factor de virulență, ci ca factor de rezistență la condițiile nefavorabile. *C. neoformans* are o capsulă consistentă în țesuturile gazdei infectate, dar în prezența nutrienților și a apei, sinteza capsulei este represată. În absența Fe, sinteza capsulei este stimulată.

Capsula activează calea alternativă a fixării complementului. C3b opsonizează celulele fungice și ușurează ingestia de către fagocite. În infecția cu *C. neoformans*, activarea amplă a C de către polizaharidul capsular, duce la epuizarea C seric și la pierderea capacității opsonizante. Serul conține Ac anti-glucuroxilomanan, dar nu au rol opsonizant. Polizaharidul capsular este slab imunogen și induce starea de toleranță.

C. neoformans se deosebește de alte levuri prin proprietățile metabolice speciale: degradează ureea. Testul aglutinării particulelor de latex tapetate cu anticorpi anti-polizaharidul capsular se folosește pentru detectarea polizaharidului în LCR și în ser.

C. neoformans se dezvoltă în excrementele de păsări, în special de porumbel, principalul rezervor de infecție, dar gazdele aviare nu sunt infectate.

Infecția este inițiată odată cu inhalarea aerosolilor contaminați cu bazidiospori sau cu celule uscate din mediul extern.

C. neoformans infectează, în primul rând, persoanele imunodeficitare (pacienții SIDA), pe cei cu malignități hematologice, dar și persoane normoreactive și produce *criptococoza*. Terapia steroidiană este alt factor predispozant.

Infecția este inițiată prin inhalarea aerosolilor din mediul extern contaminați cu levura uscată. Infecția primară pulmonară este de cele mai multe ori asimptomatică sau însoțită de simptome de tipul răcelii comune. Cele mai multe infecții pulmonare se vindecă spontan. La pacienții imunocompromiși, levura se multiplică în plămân, trece în torentul sanguin, se disemnează în SNC și produce meningoencefalita sau se localizează în tegument, în țesutul osos, prostată, globul ocular, glandele suprarenale.

Manifestarea clinică majoră este meningita cronică, cu abces cerebral și maladie degenerativă a SNC.

Probele de analiză pentru diagnostic sunt LCR, sputa, sângele, urina, țesuturile lezate. Probele se examinează în stare nativă sau după amestecul cu tuș de India pentru evidențierea capsulei.

Anticorpii din serul pacientului se detectează în reacția de fixare a complementului, prin reacția de precipitare în gel sau prin metoda latex-aglutinării. Testul tegumentar la *coccidioidină*, amestecul de polipeptide pe care agentul patogen le eliberează în mediul lichid, evaluează gradul de sensibilizare a organismului gazdă, la componentele fungice.

Agentul patogen nu se transmite de la gazdele infectate la persoanele sănătoase.

Forma diseminată a infecției se tratează cu amfotericină B.

Diagnosticul este foarte important în localizarea meningeală. Probele de analiză pentru diagnostic sunt LCR, sputa, sângele, urina, țesuturile lezate. Probele se examinează în stare nativă sau după amestecul cu tuș de India pentru evidențierea capsulei. Agentul patogen se detectează în sedimentul LCR, la microscopul cu contrast de fază.

Meningita criptococică se tratează cu amfotericina B în asociație cu 5- flucitozină.

Pneumocystis jiroveci (*Pn. carinii*) este agentul pneumoniei la persoanele imunocompromise. Inițial s-a crezut că este un protozoar, dar metodele de analiză moleculară au evidențiat afinitatea cu ascomicetele. Speciile de *Pneumocystis* se găsesc în plămânii multor specii de animale (șobolan, șoarece, câine, pisică, iepure, nevăstuică). *Pn. carinii* se găsește numai la șobolan (Brooks și col., 2007), iar specia izolată de la om este *Pn. jiroveci*, un patogen extracelular a cărui creștere este limitată la pelicula de lichid surfactant care acoperă epiteliul alveolar. Nu invadează parenchimul pulmonar.

Pneumocystis parcurge 3 stadii de dezvoltare. *Trofozoizii* sunt celule eliptice cu diametrul de 1,5–5 μm și se reproduc asexuat prin fisiune binară transversală. Doi trofozoizi haploizi de polaritate sexuală opusă fuzionează și inițiază ciclul de reproducere sexuată, formând un *sporozoid diploid.* În celula diploidă se succed 3 serii de diviziuni nucleare: prima este meiotică și rezultă 2 nuclei haploizi. Următoarele 2 diviziuni sunt mitotice și se formează 8 nuclei. Nucleii se compartimentează și rezultă 8 spori cu diametrul de 1–2 μm și rezultă al III-lea stadiu de dezvoltare – *chistul.* Peretele chistului se lizează și eliberează 8 spori din care se dezvoltă trofozoizii.

În sângele uman se găsesc anticorpi specifici. Se pare că infecția are loc timpuriu, în copilărie, iar *Pn. jiroveci* pare a fi componentă a microbiotei normale. IMC are rol determinant pentru rezistența la procesul infecțios. Simptomele clinice ale infecției apar numai la persoanele imunocompromise. Nu există rezervor natural al agentului infecțios, iar transmiterea probabil se face prin aerosoli.

Pneumocystis se multiplică în celulele epiteliale ale alveolelor pulmonare, pe care le lizează. Agentul patogen eliberat pătrunde în țesutul pulmonar și produce *pneumonia interstițială.* Din focarul pulmonar primar, agentul patogen se disemnează (1–2% din cazuri) în alte organe și produce infecții extrapulmonare (ale urechii medii, ochiului, SNC, ficatului, pancreasului etc.).

Agentul infecțios se evidențiază în lavajul bronhoalveolar, în biopsiile de țesut pulmonar, sau în spută pe preparate colorate Giemsa sau cu albastru de toluidină, unde se evidențiază chişti și trofozoizi.

Speciile de *Pneumocystis* nu se cultivă. Detectarea este ușurată de folosirea AMC specifici marcați cu fluorocromi (metoda IFD), față de un antigen al chistului.

Infecția acută se tratează cu cotrimoxazol (oral sau parenteral).

Alte specii de levuri izolate ocazional de la pacienți imunodeprimați: *Trichosporon beigelii/cutaneum* izolat din infecții fulminante la pacienți cu leucemie, transplantați, mielom multiplu, anemie aplastică, limfoame, tumori solide, SIDA, din peritonite la dializați, endoftalmite la pacienții operați de cataractă, endocardite asociate dispozitivelor protetice (Kreger – Van Rij, 1984); *Rhodotorula rubra* izolată din cazuri de peritonite, fungemii, endocardite, meningite la pacienți

dializaţi, cateterizaţi şi trataţi cu citostatice; *Malassezia furfur*, agent al pityriasis versicolor, dermatitei seboreice şi mătreţii (Guillot şi colab., 1996); *Loboa loboa*, necultivabilă, agent al lobomicozei, endemică în Brazilia, ce se manifestă prin apariţia de leziuni nodulare, keloidale, verucoide, cruste sau tumori; *Blastoschizomyces capitatis* produce infecţii diseminate la pacienţi neutropenici, leucemici sau transplantaţi, leziunile cutanate fiind similare celor din candidoza sistemică; *Saccharomyces cerevisiae,* produce ocazional fungemie, endocardită, peritonită la pacienţii SIDA, dializaţi, sau sub tratament cu citostatice.

Aspergiloza este cauzată de specii de *Aspergillus*[*], saprobionte ubicvitare în mediile naturale. Cel mai comun agent patogen pentru om este *A. fumigatus*, dar infecţiile pot fi produse şi de *A. flavus, A. niger, A. terreus*, deoarece conidiile trec cu uşurinţă în aerosoli.

[*] Denumirea de *Aspergillus* derivă din lb. Latină şi înseamnă "perie cu coadă", cu care seamănă condioforul cu lanţurile de conidii.

Maladiile umane produse de *Aspergillus* sunt de 3 tipuri: alergii, aspergilomul şi aspergiloza invazivă.

Alergia este consecinţa unei hiper-reactivităţi imunitare la indivizii atopici.

Aspergiloza este cauzată de specii de *Aspergillus*, saprobionte ubicvitare în mediile naturale. Cel mai comun agent patogen pentru om este *A. fumigatus*, dar infecţiile pot fi produse şi de *A. flavus, A. niger, A. terreus*, deoarece conidiile trec cu uşurinţă în aerosoli. Aspergiloza cu *A. fumigatus* este frecventă la puii de găină în primele zile după ecloziune, la care produce micoze de amploarea unei epidemii. Miceliul se dezvoltă abundent în plămân şi respiraţia devine imposibilă. Produce avortul la bovine, ovine etc. Omul prezintă rezistenţă naturală la infecţia cu *A. fumigatus*. Cazurile de îmbolnăvire sunt rare.

Poarta de intrare a sporilor este tractul respirator, dar *Aspergillus* poate să invadeze prin leziuni ale tegumentului sau prin mucoase.

După inhalarea conidiilor, persoanele atopice manifestă reacţii alergice severe faţă de antigenele conidiale. La persoanele imunocompromise, conidiile germinează în epiteliul tractului respirator şi invadează plămânii şi alte ţesuturi.

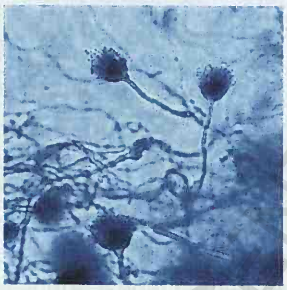


Fig. 485. Aspectul culturii de *Aspergillus niger* la 48 de ore, pe mediu Sabouraud (stânga) (foto Elvira Borcan). Aspectul microscopic al miceliului de *Aspergillus terreus* (dr.) (Porter, C.).

Aspergillus creşte pe o varietate de medii pentru fungi şi pentru bacterii. Coloniile sunt pudrate sau catifelate, adeseori cu un centru bombat. Hifele sunt septate, cu excepţia conidioforilor, care sunt neseptaţi. Conidioforii sunt lungi, cu o veziculă terminală de formă sferică, pe suprafaţa căreia sterigmele (fialidele) produc lanţuri de conidii (fig. 485). Speciile se identifică pe criteriul morfologic al acestor structuri: dimensiuni, textură, culoare.

Patogeneză. Organismul normoreactiv se apără de invazia fungică. Conidiile inhalate sunt fagocitate de macrofagele din alveolele pulmonare şi sunt digerate.

Patogeneza indusă de *Aspergillus* (*A. fumigatus, A. nidulans, A. niger, A. oryzae*) poate fi clasificată astfel:

– colonizare saprobiontă (aspergiloza bronho-pulmonară saprobiontă şi aspergilomul bronho-pulmonar);
– maladii alergice (astm, rinită, sinuzită alergică, pneumonie hipersensibilă (HP), aspergiloză bronho-pulmonară alergică (ABPA);
– infecţii sistemice (aspergiloza invazivă), la persoanele imunocompromise, la neutropenici, la cei trataţi cu doze mari de corticosteroizi, la pacienţii SIDA în stadiul final, dar rară la imunocompetenţi (Kumar şi colab., 1991).

Conidiile inhalate sunt fagocitate de macrofagele din alveolele pulmonare şi sunt digerate. La persoanele imunocompromise şi în condiţii experimentale, la animalele tratate cu corticosteroizi, capacitatea macrofagelor de a elimina agentul fungic invadator diminuează şi inoculul infecţios nu mai este anihilat. În plămân, conidiile germinează şi formează hife, care au tendinţa să invadeze alveolele şi vasele de sânge.

La persoanele atopice (cu predispoziție genetică), alergenele conidiale stimulează sinteza IgE și induc reacția de *hipersensibilitate imediată* cu manifestare astmatică. La alți pacienți, hifele rezultate din germinarea conidiilor, colonizează epiteliul tractului respirator profund, dar nu invadează parenchimul pulmonar. În sputa pacienților se găsesc conidii de *Aspergillus,* în ser se detectează anticorpi specifici și respirația devine greoaie.

Aspergilomul (micetomul, globulul fungic) este o altă varianta clinică a infecției *Aspergillus* și se datorează germinării conidiilor și formării hifelor abundente în spațiile aeriene ale plămânului, care iau aspecul unei sfere fungice. Riscul aspergilomului este mai mare la pacienții cu leziuni cavitare preexistente (cazeomul tuberculos). Pacienții prezintă toate simptomele infecției tuberculoase: tuse, oboseală, pierdere în greutate, hemoptizie, la care se adaugă dispneea, datorită creșterii hifelor în sacii alveolari. De obicei, aspergilomul este neinvaziv: infecții locale neinvazive (colonizări) se produc în sinusurile nazale, în urechea medie, în epiteliul corneean, în unghii.

Aspergiloza invazivă este un proces infecțios pulmonar acut, consecutiv inhalării și germinării conidiilor. Pacienții cu risc sunt cei cu neoplazii leucocitare, cu limfom, pacienții SIDA în stadiile tardive ale evoluției, cei cu transplant de măduvă osoasă, cei tratați cu corticosteroizi. Hifele invadează endoteliul și lumenul vascular și produc tromboze, infarct și necroză tisulară. Din plămân, infecția se disemineză pe cale sanguină în tractul gastro-intestinal, în rinichi, în creier etc., producând abcese și leziuni necrotice. În absența tratamentului adecvat, cu itraconazol sau cu amfotericină B, aspergiloza invazivă evoluează rapid și este letală.

Factorii de virulență ai fungilor invazivi sunt numeroși: cei mai importanți sunt *protează*. Proteazele degradează materia organică vegetală și animală în mediul extern, dar și țesutul conjunctiv elastic pulmonar. *A. fumigatus* secretă o serin-protează și o metalo-protează. *Aspergillus* sp. produce catalază, ce descompune H_2O_2 proprie, dar și H_2O_2 produs în 'explozia metabolică' a fagocitelor. Asocierea aspergilozei cu CGD (boala cronică granulomatoasă) este dovada rolului catalazei ca factor de virulență. Neutrofilele pacienților cu CGD nu sunt capabile de explozia metabolică și de aceea sunt sensibili la infecții cu patogeni pozitivi pentru catalază.

A. fumigatus produce *gliotoxina*, cu proprietăți toxice și imunosupresoare cu spectru larg: inhibă activitatea fagocitară și induce apoptoza macrofagelor, inhibă activarea limfocitelor T.

A. flavus produce aflatoxine, cu efect carcinogen.

Hifele de *A. fumigatus* activează calea alternativă a C, în serul uman normal: C3b și C3bi se depun pe suprafața hifelor și le opsonizează, ușurând ingestia de către fagocite.

La persoanele imunocompromise și în condiții experimentale, la animalele tratate cu corticosteroizi, capacitatea macrofagelor de a elimina agentul fungic invadator diminuează și inoculul nu mai este anihilat. În plămân, conidiile germinează și formează hife, care au tendința să invadeze alveolele și vasele de sânge. Hifele invadează endoteliul și lumenul vascular și produc tromboze, infarct și necroză tisulară. Din plămân, infecția se disemineză pe cale sanguină în tractul gastro-intestinal, în rinichi, în creier etc., producând abcese și leziuni necrotice. În absența tratamentului adecvat, cu itraconazol sau cu amfotericină B, aspergiloza invazivă evoluează rapid și este letală.

Mecanisme de apărare antifungică. Majoritatea conidiilor inhalate sunt reținute în tractul respirator superior. Secreția mucoasă și cilii celulelor epiteliale elimină conidiile prin înghițire în tractul digestiv. Când ajung în țesutul pulmonar, macrofagele alveolare – prima linie de apărare a organismului – fagocitează conidiile, nu le omoară, dar împiedică germinarea lor. În serul pacienților se sintetizează IgG și IgE la titruri crescute. Formarea granulomului pulmonar cu infiltrat limfocitar, este dovada imunității celulare la pacienții cu ABPA.

Probele de analizat sunt sputa, biopsia țesutului pulmonar.

Diagnosticul este îngreunat de faptul că *Aspergillus* este un contaminant frecvent al materialului analizat. Detectarea hifelor tipice, ramificate dichotomic, de aceeași grosime, în preparatul primar din spută, din biopsii și creșterea în culturi repetate argumentează diagnosticul.

Antigenele de *Aspergillus* (galactomananul) se detectează cu particule de latex tapetate cu AMC într-o reacție de aglutinare.

Evidențierea anticorpilor serici este o metodă de diagnostic, într-o reacție cu antigene fungice reprezentate de extracte miceliene sau de produși metabolici secretați în mediul de creștere. Nu sunt disponibile preparate antigenice standardizate pentru diagnosticul imunologic al maladiilor induse de

Aspergillus. Componentele chimice ale preparatelor antigenice diferă (filtratul culturii sau extractul micelian). Antigenele fungice sunt proteine, polizaharide sau glicoproteine. Testele serologice se folosesc pentru diagnosticul variatelor tipuri de aspergiloză la pacienții imunocompetenți. La cei imunosupresați, nu se detectează anticorpi. În acest caz, pentru diagnostic trebuie detectat antigenul.

Imunodifuzia este cea mai folosită pentru diagnosticul aspergilozei, dar nu are sensibilitate deoarece antigenele solubile precipită la titru relativ crescut al anticorpilor şi nu dă informații cantitative despre concentrația anticorpilor serici. Antigenul este preparat din extractul fungic sau din filtratul culturii.

Aspergiloza se tratează cu doze mari de *Aspergillus* şi cu compuşi azolici.

Fig. 486. Cultură de *Paecilomyces lilacinus,* cu pigment de nanță deschisă, caracteristic hialohifomicetelor (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Acremonium cuprinde 100 de specii, dintre care unele sunt recunoscute ca agenți oportunişti la om şi animale, fiind agenți ai hialohifomicozelor (artrită, osteomielită, peritonită, endocardită, pneumonie, infecții cerebrale şi subcutanate). Speciile de *Fusarium* produc keratite micotice, onicomicoze, hialohifomicoze (cutanate, subcutanate, endoftalmite, artrite, osteomielite) la arşi, consecutiv unor leziuni traumatice, la dializați).

Geotrichum candidum este agentul geotrichozei, cu afectare pulmonară, dar şi orală, bronhială, vaginală, cutanată şi digestivă.

Onychocola canadensisi şi *Scopulariopsis* produc ocazional onicomicoza distală, laterală sau subunghială.

Paecilomyces (fig. 486) sunt agenți emergenți ai keratiei micotice şi ai hialohifomicozelor la pacienții imunodeprimați, la care aceasta poate îmbrăca diferite forme clinice: peritonita, endoftalmita, endocardita, pielonefrita, sinuzita şi leziunile cutanate.

Speciile de *Penicillium* sunt rar implicate în patogeneza umană, însă poate produce infecții oportuniste (artrite micotice, otomicoze, endocardite, infecții pulmonare sau sistemice) la pacienții dializați, SIDA (mai ales specia *P. marneffei*) sau la cei cu valve artificiale (Samson şi colab., 1984).

Trichoderma viride produce infecții pulmonare şi peritonite la dializați.

Zigomicozele (mucormicozele) este produsă din fungi clasificați în clasa *Zygomycetes*, saprobionți ubicvitari termotoleranți pe materia organică, relativ rar izolați în laboratorul clinic. Fungii care produc infecția la om sunt incluşi în două ordine: *Mucorales* şi *Entomophtorales*. Sunt fungi filamentoşi, cu hife neseptate delimitate de pereți groşi. Hifele se ramifică la unghi aproape drept. Se cultivă uşor pe mediul Sabouraud şi formează un miceliu aerian scămos. Persoanele cu risc de infecție fiind cele imunocompromise, iar speciile implicate în patologia umană sunt: *Rhizopus* (sp. *oryzae* = *R. arrhizus,* produce peste 60% dintre cazurile de zigomicoze, 90% fiind infecții rinocerebrale) (fig. 487), *Rhizomucor* (produce infecții cutanate, pulmonare, sistemice), *Mucor* (din cele peste 50 de specii, câteva specii termofile sunt implicate în infecții cutanate), *Apophysomyces elegans* (infecții invazive), *Conidiobolus coronatus* (infecții rino-faciale în zonele tropicale), *Cunninghamella bertholletiae* (infecții de plagă traumatică), *Absidia corymbifera* (produce infecții pulmonare, rinocerebrale, ale SNC, sistemice, cutanate), *Saksenaea vasiformis* (infecții diseminate posttraumatice, infecții rinocerebrale şi cutanate) etc. (Domsch şi colab., 1980; Ellis, 1997).

Sporangiosporii invadează căile aeriene, producând tromboza, infarctul şi necroza tisulară.

Mucoralele sunt agenți infecțioşi tipic *oportunişti*, care produc infecții numai la pacienții imunodeficitari sau cu maladii metabolice (diabet, neutropenie, terapie imunosupresoare de durată, administrarea cronică a prednisonului, terapia cu chelatori ai Fe, administrarea de lungă durată a antibioticelor cu spectru larg de acțiune, malnutriția severă, alterarea traumatică sau chirurgicală a integrității tegumentului, arsuri).

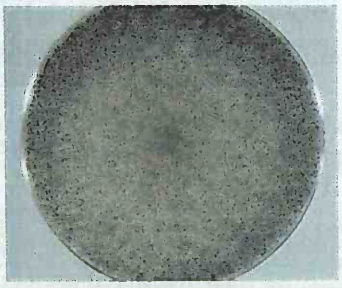


Fig. 487. Aspectul culturii de *Rhizopus* (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Zigomicoza apare rareori la persoanele imunocompetente. Cele mai frecvente localizări sunt infecțiile rinocerebrale şi pulmonare, rareori gastro-intestinale.

Sporangiosporii invadează căile aeriene odată cu praful. Au afinitate mare pentru structurile vasculare, unde se dezvoltă, producând tromboza, infarctul şi necroza țesuturilor implicate, mediată de proteazele, lipazele şi de toxinele fungice.

Infecțiile se clasifică după manifestările clinice:

– mucormicoza rinocerebrală se disemineză din mucoasa nazală sau din sinusuri şi poate să implice creierul. De cele mai multe ori este o consecință a acidozei diabetice;
– mucormicoza pulmonară se manifestă în special la neutropenici după tratamentul cu citostatice;
– mucormicoza gastro-intestinală apare rareori la copiii subnutriți;
– mucormicoza cutanată este consecința leziunilor tegumentare ample (arsuri);
– mucormicoza diseminată, consecutivă celei pulmonare.

Utilizarea deferoxaminei – chelator al metalelor – pentru tratamentul supraîncărcării organismului cu Fe sau Al se corelează intens cu mucormicoza.

Diagnosticul mucormicozei se pune după examenul microscopic şi evidențierea hifelor fungice în țesutul infectat. Nu există metode de diagnostic serologic.

Amfotericina B este cel mai bun agent terapeutic pentru mucormicoze.

28.4. Terapia infecțiilor fungice

Cele mai multe micoze (tabelul 75) se tratează cu dificultate, deoarece fungii au un număr mare de gene şi produse genice omologe cu ale gazdei umane şi rămân puține ținte unice pentru agenții chimioterapeutici şi pentru antibiotice. Infecțiile cutanate se tratează cu griseofulvină, itraconazol, miconazol, clotrimazol sau cu alți agenți antifungici cu aplicație locală. Majoritatea infecțiilor cu dermatomicete* se pot trata eficient cu *griseofulvina*, un antibiotic antifungic cu administrare orală de lungă durată (luni de zile), sintetizat de *Penicillium griseofulvum.* Griseofulvina se administrează local pentru tratamentul dermatomicozelor (infecțiile tegumentului, părului, unghiilor), pentru că se concentrează în celulele stratului cornos al epidermei, la valori inhibitoare pentru creşterea hifelor fungice. În hifele miceliene, griseofulvina interacționează cu proteinele microtubulilor, dezorganizează fusul mitotic şi inhibă creşterea. Antibioticul este activ numai asupra hifelor care cresc. Este bine tolerată, cu efecte secundare minime.

* Testele de sensibilitate la antifungice pentru dermatomicete nu sunt încă standardizate, iar datele disponibile sunt limitate. Majoritatea cercetătorilor utilizează metodologia modificată corespunzătoare CLSI (M38P).
Terbinafin şi itraconazolul sunt active față de *Microsporum*, însă în unele studii acesta este mai puțin sensibil la terbinafin. Terapia orală cu aceste antifungice este larg utilizată pentru tratamentul infecțiilor cu *Microsporum*.

Tabelul 75.

Infecții fungice localizate: agenți etiologici, produse patologice şi diagnostic (Brooks şi colab., 2007).

Infecție	Produs patologic	Teste de diagnostic
Micoze invazive		
Aspergiloză: *A. fumigatus*, alte specii de *Aspergillus*		
Pulmonară	Secreții de tract respirator	Dozarea galactomananului
Diseminată	Biopsie, sânge	Dozarea galactomananului Cultivare dificilă
Blastomicoză: *Blastomyces dermatiditis*		
Pulmonară	Secreții de tract respirator	Fixarea complementului Reacții imunoenzimatice Cultivare
Ulcere orale, cutanate	Biopsie, tampon	Fixarea complementului Reacții imunoenzimatice Cultivare Antigen urinar
Osoasă	Biopsie osoasă	Fixarea complementului Reacții imunoenzimatice Cultivare Antigen urinar.

BCU IASI CEN ACADEMY LIBRARY

Coccidioidomicoză: *Coccidioides immitis*		
Pulmonară	Secreţii de tract respirator	Fixarea complementului Reacţii imunoenzimatice Cultivare pe geloză sânge Imunoprecipitare Imunodifuzie Latex aglutinare Hibridizare ADN
Diseminată	Biopsie la situl infecţiei	Fixarea complementului Reacţii imunoenzimatice Cultivare pe geloză sânge Imunoprecipitare Imunodifuzie Latex aglutinare Hibridizare ADN.
Histoplasmoză: *Histoplasma capsulatum*		
Pulmonară	Secreţii de tract respirator	Fixarea complementului Imunodifuzie Evidenţierea antigenului în urină, ser, spălătură bronho-alveolară
Diseminată	Biopsie la situl infecţiei, măduvă osoasă, sânge	Fixarea complementului Imunodifuzie Evidenţierea antigenului în urină, ser, spălătură bronho-alveolară.
Nocardioză: *Nocardia asteroides*		
Pulmonară	Secreţii de tract respirator	Coloraţie Ziehl modificată
Subcutanată	Aspirat sau biospia abcesului	
Cerebrală	Biospie	
Paracoccidioidomicoză (blastomicoza sud americană): *Paracoccidioides brasiliensis*		
	Biopsie din leziune	Immunodifuzie, Fixarea complementului
Sporotrichoză: *Sporothrix schenckii*		
Noduli cutanaţi şi subcutanaţi	Biopsie	Aglutinare Cultivare
Diseminată	Biopsie	Aglutinare
Zygomicoză (phycomicoză, mucormicoză): *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. etc		
Rinocerebrală	Ţesut nazo-orbital	Hife neseptate vizibile la microscop
Cutanată; pulmonară şi diseminată	Secreţii respiratorii, biopsie	Cultivare
Infecţii levurice		
Candidoză: *Candida albicans, C tropicalis, C parapsilosis, C glabrata*		
Mucoasă	Secreţii	Examinare directă la microscop Cultivare
Cutanată	Tampon	
Sistemică	Sânge, produs de biopsie, urină	Immunodifuzie, test cutanat
Criptococoză: *Cryptococcus neoformans*		
Pulmonară	Secreţii respiratorii	Detectarea antigenului rar pozitivă
Meningită	LCR	Detectarea antigenului în LCR
Diseminată	Măduvă osoasă, sânge, ţesut osos	Detectarea antigenului în ser
Infecţii pimare cutanate		
Dermatofitoză: *Microsporum* sp., *Epidermophyton* sp., *Trichophyton* sp.		
	Fire de păr, ţesut cutanat, unghii din zonele afectate.	

Agenţii antifungici disponibili pentru tratamentul infecţiilor micotice sistemice sunt limitate ca număr şi eficienţă (tabelul 76), deoarece fungii sunt organisme eucariote şi din punct de vedere biochimic se aseamănă cu organismul gazdă. Asemănarea face ca dezvoltarea unui medicament eficient faţă de agentul invadator, dar sigur pentru gazdă, să necesite un studiu de durată în cercetarea de bază şi în clinică.

Primul agent cu activitate antifungică (griseofulvina) a fost izolat în 1939, iar primul agent polienic antifungic, *nistatinul*, a fost descoperit în 1949.

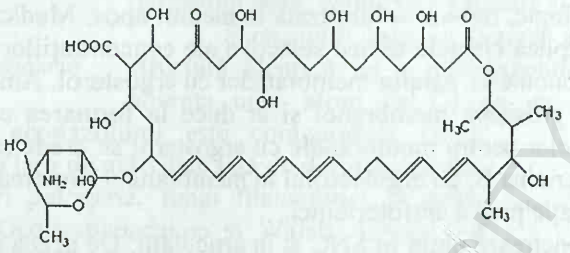
Clasele de medicamente disponibile pentru tratamentul infecţiilor fungice sunt:

– poliene (amfotericina B şi nistatinul;
– flucitozina, un analog pirimidinic;
– compuşii azolici şi alţi inhibitori ai sintezei ergosterolului;

UMF "CAROL DAVILA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

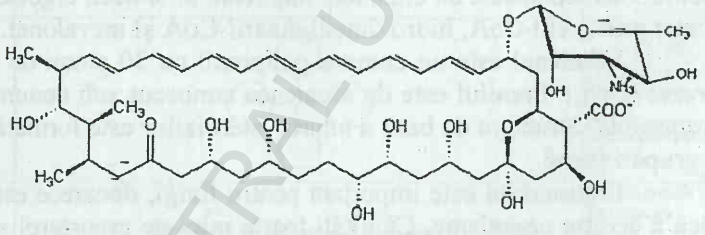
– echinocandidele, inhibitoare ale sintezei β-glucanului parietal;
– griseofulvina, inhibitoare a asamblării microtubulilor fusului de diviziune.

Polienele. Antibioticele polienice (nistatinul şi amfotericina B) se sintetizează pe o cale metabolică asemănătoare cu aceea a antibioticelor macrolide (eritromicina). Structural, macrolidele se caracterizează prin inele lactonice multiunitare, care poartă numeroşi substituienţi: grupări metil, hidroxil, glucide specifice şi cel puţin un grup carbonil. Subgrupul polienelor conţine o serie de legături duble (între 4 şi 7) conjugate. Prezenţa regiunilor foarte polare şi a celor nepolare în moleculele polienice le conferă caracterul *amfipatic*, ceea ce explică solubilitatea şi mecanismul de acţiune. Aciditatea se datorează grupării carboxil, iar caracterul bazic este conferit de micozamină, un glucid aminat izolat din nistatin şi amfotericina B.



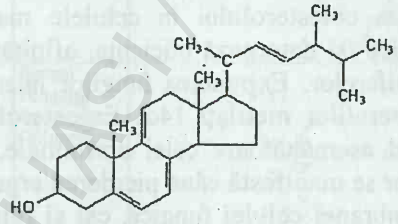
Structura moleculară a nistatinului

Mecanismul de acţiune. Medicamentele din clasa *polienelor*, în special *amfotericina B* (utilizată din 1960), au fost considerate cele mai eficiente dintre toţi agenţii antifungici cu administrare sistemică. Polienele sunt o clasă de medicamente cu acţiune selectivă numai asupra membranelor ce conţin *ergosterol:* de aceea sunt inhibitorii pentru fungi, dar nu sunt active faţă de bacterii. Acţiunea diferenţiată a permis relevarea unor diferenţe biochimice importante între bacterii şi fungi.

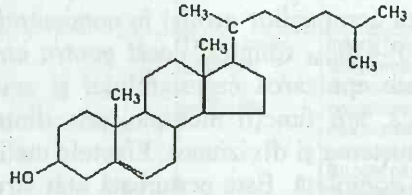


Structura moleculară a amfotericinei B

Majoritatea medicamentelor antifungice au ca ţintă molecula de *ergosterol*, sterolul major al membranei plasmatice a fungilor, analogul structural al *colesterolului* din celula mamiferelor (Hector, 1993).



Structura moleculară a ergosterolului



Structura moleculară a colesterolului

Ergosterolul din membrana fungică contribuie la o varietate de funcţii celulare: este sediul chitin-sintetazei, importantă pentru creşterea şi diviziunea celulei, este important pentru fluiditatea şi integritatea membranei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Situsul acţiunii antibioticelor polienice este membrana citoplasmatică şi ca rezultat al legării polienelor îşi pierde funcţia de barieră selectivă de permeabilitate. Medicamentele se *intercalează* în membrane şi formează un *canal*, prin care componentele celulare, în special ionii de K, părăsesc citoplasma şi alterează gradientul protonic al membranei. Oligomerii se formează prin asocierea monomerilor în conexiune cap-coadă, formându-se complexe suficient de lungi pentru a străpunge membrana şi să inducă efectele lezionale.

Sensibilitatea la poliene se manifestă şi la alte grupe de organisme: alge, protozoare (*Leishmania donovani*). Antibioticele polienice sunt relativ toxice pentru *eritrocitele* mamiferelor.

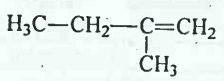
Amfotericina B este mai activă faţă de celulele fungice, decât faţă de cele mamaliene, datorită tipului de sterol încorporat în membrană. Amfotericina induce peroxidarea lipidelor din structura membranei, rezultatul fiind modificarea permeabilităţii. Amfotericina B este insolubilă în apă, iar pentru a deveni activă biologic, trebuie solubilizată în mediul apos. Medicamentul nu interacţionează cu colesterolul, ceea ce explică efectele toxice selective ale concentraţiilor mici de amfotericină B, la care medicamentul este monomeric, asupra membranelor cu ergosterol. Amfotericina monomerică s-ar asocia cu ergosterolul în grosimea membranei şi ar duce la formarea canalelor transmembranare. Specificitatea medicamentelor pentru membranele cu ergosterol se crede că se datorează interacţiunii canalului format de amfotericina B, cu ergosterolul în membrană. Formarea canalelor oligomerice este condiţionată de o concentraţie prag a amfotericinei.

Amfotericina B penetrează puţin în SNC şi în articulaţii. De aceea se recomandă, pentru unele infecţii, administrarea intraarticulară.

Reacţiile adverse acute la amfotericina B injectată intravenos, se manifestă la toţi pacienţii (febră, frisoane, dispnee, hipotensiune), iar cele cronice sunt de nefrotoxicitate.

Nistatinul, cu administrare locală, se foloseşte pentru tratamentul candidozei orale şi vaginale. Inhibă candidoza esofagiană şi gastro-intestinală după administrare orală, nu se absoarbe sistemic şi nu dă efecte secundare. Nu se administrează parenteral, deoarece este prea toxic.

Inhibitorii biosintezei ergosterolului. Compuşii azolici, alilaminele, tiocarbamaţii şi morfolinici se folosesc în tratamentul micozelor ca inhibitori ai căii de biosinteză a *ergosterolului.* Toate aceste medicamente interacţionează cu enzimele implicate în sinteza ergosterolului din *squalen*, care este produs din acetat prin acetil-CoA, hidroximetilglutaril-CoA şi mevalonat.



Structura moleculară a grupului prenil

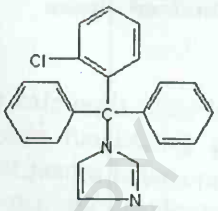
Squalenul este un compus poliprenil cu 30 atomi de C (conţine 6 unităţi *prenil* (C_5H_8). Prenilul este de asemenea cunoscut sub denumirea de *izopren* sau *izoprenoid.* Structura de bază a tuturor steroizilor este formată prin condensarea a 6 grupări prenil.

Ergosterolul este important pentru fungi, deoarece este sterolul dominant în membrana plasmatică a acestor organisme. Cantităţi foarte mici de ergosterol sunt necesare pentru ca celulele să progreseze în ciclul celular.

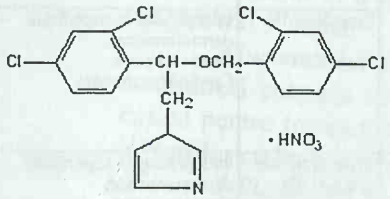
În 1969, doi compuşi propuşi de două laboratoare diferite au fost introduşi în clinică pentru tratamentul infecţiilor fungice: *clotrimazol* şi *miconazol.* A urmat *econazolul* (1974). Aceşti 3 compuşi azolici rămân cei mai importanţi pentru terapia multor dermatomicoze.

Mecanismul de acţiune. Agenţii azolici antifungici inhibă *sinteza ergosterolului*, prin inhibiţia *lanosterol-demetilazei*, enzimă dependentă de citocromul P_{450}, denumită şi 14α-sterol-demetilază ($P\text{-}450_{DM}$). Aceiaşi enzimă are rol important în sinteza colesterolului în celulele mamiferelor. Administrarea compuşilor azolici în concentraţii terapeutice îşi datorează eficienţa, afinităţii lor mai mari pentru $P\text{-}450_{DM}$ fungică, decât pentru enzima mamiferelor. Expunerea fungilor la un compus azolic produce epuizarea ergosterolului şi acumularea sterolilor metilaţi 14α. Ergosterolul, pentru celula fungică, are funcţii multiple, una dintre ele fiind asemănătoare celei hormonale, deoarece stimulează creşterea şi diviziunea. Efectele medicamentelor se manifestă când pierderea ergosterolului este aproape completă. Este perturbată atât structura membranei celulei fungice, cât şi funcţiile sale esenţiale: permeabilitatea selectivă şi transportul nutrienţilor, sinteza chitinei (Hector, 1993). Rezultatul net este inhibiţia creşterii fungice. Agenţii azolici antifungici utilizaţi în clinică, conţin 2 sau 3 atomi de N în inelul azolic şi sunt clasificaţi ca *imidazoli* (de exemplu, ketoconazol, miconazol, clotrimazol) sau ca *triazoli* (itraconazol şi fluconazol). Cu excepţia ketoconazolului, folosirea imidazolilor şi triazolilor este limitată la tratamentul micozelor superficiale. La concentraţii mari, compuşii azolici pot să interacţioneze direct cu lipidele membranare.

Clotrimazolul este activ, *in vitro*, față de dermatomicete, dar și față de unele bacterii Gram pozitive. În clinică se folosește pentru tratamentul infecțiilor fungice superficiale (tinea versicolor, infecții orale și vaginale cu *Candida*). Activitatea clotrimazolului, *in vitro*, este comparabilă cu a amfotericinei B. Este mai activ decât *griseofulvina* și *nistatinul*. Acționează asupra membranei celulei fungice, a cărei permerabilitate o perturbă.



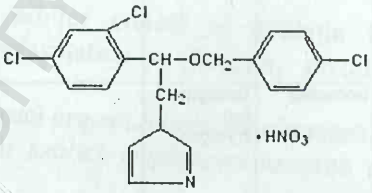
Structura moleculară a clotrimazolului



Structura moleculară a miconazolului

Miconazolul este un derivat fenetil-imidazol. Are toxicitate suficient de mică, astfel încât se administrează intravenos, pentru terapia infecțiilor fungice sistemice. Este eficace pentru tratamentul infecțiilor fungice superficiale: dermatomicoze, candidoză cutanată și vaginală.

Econazolul este un derivat antifungic imidazolic, cu o structură identică cu a miconazolului, deosebirea constând în absența unui atom de Cl pe un inel benzenic. Activitatea antifungică *in vitro* a econazolului este comparabilă cu a miconazolului: are spectru larg de activitate față de dermatomicete, *Candida* spp., alte levuri patogene, fungi filamentoși și unele bacterii Gram pozitive (Georgopapadakou și Walsh, 1996). S-a folosit pentru terapia locală a micozelor superficiale (tinea versicolor, candidoză cutanată). Nu este adecvat pentru administrare sistemică, deoarece se leagă stabil de proteinele serice.

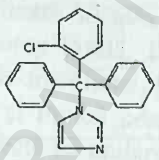
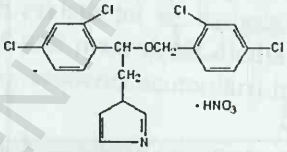
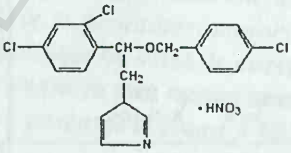
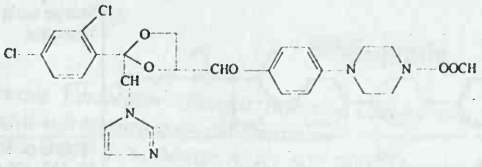
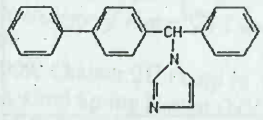


Structura moleculară a econazolului

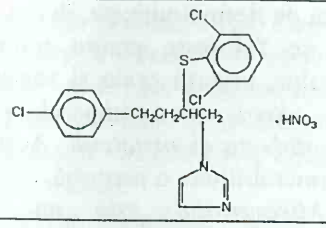
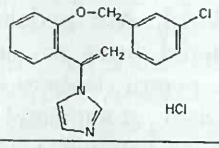
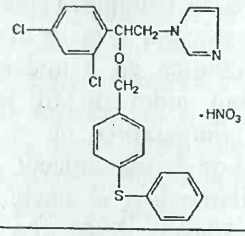
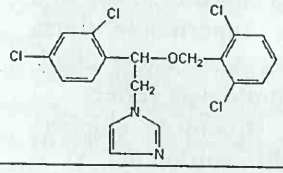
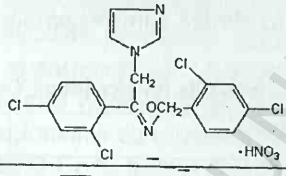
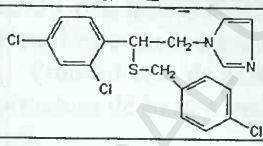
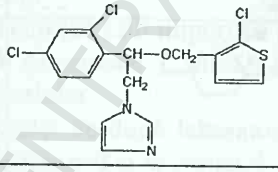
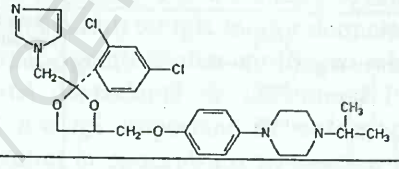
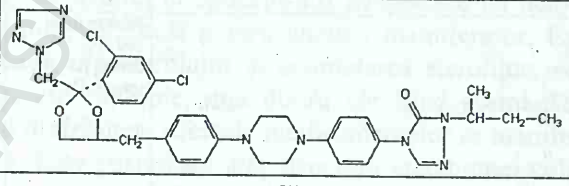
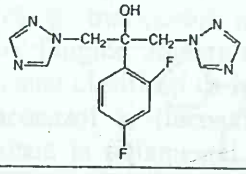
Denumirile generice și comerciale, structurile chimice, formulările și indicațiile privind imidazolii antifungici și a terconazolului, un derivat triazolic, utilizabili în clinică sunt prezentate în tabel.

Tabelul 76.

Principalii agenți terapeutici utilizați în infecțiile fungice (după Topley și Wilson's, 1998).

Denumire	Denumire comercială	Formulă chimică	Compoziție	Indicații terapeutice
Clotrimazol	Canesten Mycelex Mycelex – G Lotrimin Gyne-Lotrimin Fungoid		Tablete vaginale 100, 200, 500 mg. Tablete orale 10 mg. Creme și loțiuni 2%.	Infecții fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale.
Miconazol	Minostat Minostat-Derm Minostat i.v.		Soluție sterila parenterala 10 mg. Supozitoare vaginale 20 mg. Creme și loțiuni 2%.	Infecții fungice sistemice, coccidioidomicoze, candidoze, criptococcoze, paracoccidioido-micoze, pseudoallescherioze, candidoze cronice mucocutanate.
Econazol	Spectazol Pevaryl		Creme topice, vaginale, spray, pudre.	Infecții fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale.
Ketonazol	Nizoral Fungarol Fungarest Orifungal		Tablete orale 200 mg. Cremă și soluție 1%.	Infecții fungice sistemice, blastomicoze, anumite forme de coccidioidomicoze și histoplasmoze, candidoze mucocutanee cronice, paracoccidioido-micoze. **Nu sunt recomandate în meningite fungice,** Infecții cutanate superficiale, dermatomicoze, *Tinea* versicolor.
Bifonazol	Mycospor Mycosporan		Cremă și soluție 2%.	Infecții fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze cutanate.

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITY LIBRARY

Butaconazol	Femstat		Cremă vaginală 1%. Ovule vaginale 100 mg.	Candidoze vaginale.
Croconazol	Pilzein		Cremă/gel 1%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, Candidoze cutanate
Fenticonazol	Lomexin		Creme vaginale şi topice 2%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale şi cutanate.
Isoconazol	Travogen Gyn-Travogen		Creme vaginale şi topice 2%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, Candidoze vaginale şi cutanate
Oxiconazol	Oceral Myfungar Gyno-Myfungar Okinazol Derimin		Creme, spray-uri, pudre 1%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale şi cutanate.
Sulconazol	Exelderm Sulcosyn		Creme 1%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale şi cutanate.
Tioconazol	Trosyd Gyn-Trosyd		Creme, pudre, loţiuni, spray 1%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale şi cutanate.
Terconazol (trionazol)	Terazol Gyn-Terazol Fungistat		Creme vaginale 0.8%. Ovule vaginale 40, 80 mg.	Candidoze vaginale.
Itraconazol	Sporanox		Capsule orale 100 mg. Soluţie orala 10mg/ml.	Infecţii fungice superficiale şi sistemice inclusiv *tinea versicolor*, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale cutanate şi sistemice, aspergiloze sistemice, sporotrichoze, chromomicoze.
Fluconazol	Diflucan		Tablete orale 50, 10, 150, 200 mg. Suspensie orală 10, 40 mg/ml. Soluţie sterilă i.v. 2 mg/ml	Infecţii fungice superficiale şi sistemice inclusiv *tinea versicolor*, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale cutanate şi sistemice. **Indicate special în meningite fungice.**

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ketoconazolul este un derivat imidazolic antifungic, activ pe cale orală. Este indicat pentru tratamentul blastomicozei, histoplasmozei diseminate. Acţiunea sa este fungistatică şi eliminarea infecţiei necesită o activitate normală a funcţiei imunitare. Este eficient pentru tratamentul infecţiilor fungice superficiale. Studiile dublu-orb (placebo şi medicament) au evidenţiat eficienţa medicamentului în tratamentul tinea versicolor. Reacţiile adverse, limitante ale dozei, sunt starea de rău general şi voma.

Fluconazolul este activ faţă de *C. albicans in vitro* şi *in vivo* şi s-a folosit pentru tratamentul candidozei cutanate şi orofaringiene. Deoarece administrarea orală este avantajoasă, utilizarea s-a extins pentru tratamentul altor infecţii fungice: criptococoza, histoplasmoza, coccidioidomicoza şi a infecţiilor cu fungi dimorfici (Van Etten şi colab., 1991).

5-flucitozina este încorporată în celulă de o citozin-permează şi dezaminată în 5-fluorouracil, de o citozin-dezaminază. 5-fluocitozina are acţiune specific antifungică, deoarece celulele mamiferelor nu conţin citozin-dezaminază.

Mecanismul primar de acţiune al compuşilor azolici constă în inhibiţia biosintezei ergosterolului, componentă esenţială a membranei citoplasmatice a fungilor, rezultatul fiind acumularea lanosterolului sau a altor intermediari sterolici.

Activitatea antifungică primară de inhibiţie a biosintezei ergosterolului membranar tinde să fie o acţiune fungistatică şi nu fungicidă. De aceea, derivaţii azolici antifungici necesită activitatea funcţiei imunitare pentru a elimina fungii invadatori.

Flucitozina (5-fluorocitozina) este derivatul fluorurat al citozinei, un agent antifungic inhibitor pentru speciile de levuri. Este convertită în celula fungică la 5-fluorouracil, care inhibă timidilat-sintetaza, producând un deficit al timinei şi al sintezei ADN. Este eficientă pentru tratamentul infecţiilor *dematiaceae* (cele care produc pigmenţi şi leziuni tegumentare colorate) şi are o penetrare bună, chiar în SNC.

Griseofulvina, un antibiotic cu administrare orală de lungă durată (luni de zile), sintetizat de *Penicillium griseofulvus* se foloseşte pentru tratamentul dermatomicozelor (infecţiile tegumentului, părului, unghiilor). După aplicare locală, este puţin absorbită şi concentrată în stratul cornos al epidermei, unde inhibă creşterea hifală. După administrare orală, griseofulvina se acumulează în ţesuturile keratinizate. În hifele miceliene, griseofulvina interacţionează cu proteinele microtubulilor, dezorganizează fusul mitotic şi inhibă creşterea. Antibioticul este activ numai asupra hifelor care cresc. Este bine tolerată, cu efecte secundare minime.

Cauza comună a rezistenţei se datorează unei tulpini fungice sensibilă la o concentraţie minimă inhibitorie (CMI) mai mare decât media. Alte cauze ale rezistenţei sunt modificarea căii de biosinteză a ergosterolului, scăderea acumulării medicamentului în celula fungică, acţiunea pompelor de eflux.

Pompele de eflux ale celulelor eucariote sunt *transportori ABC* (ATP binding cassette), cu rol în efluxul substanţelor toxice şi *facilitatori majori* (MF). Ultimii au rol în efluxul moleculelor relativ hidrofobe (tetraciclina) şi folosesc ca sursă de energie forţa proton motrice (gradientul transmembranar de H^+. În general, MF funcţionează prin mecanismul antiport, adică protonii sunt pompaţi în celulă, iar moleculele substratului sunt pompate la exterior (White şi colab., 1998).

Bibliografie

Ahmed K. 2009. Pityriasis Versicolor :Fungal Infection,Causes and Treatment. http://www.neelscorner.com/pityriasis-versicolor-fungal-infectioncauses-and-treatment/

Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition http:// www.accessmedicine.com

CliffsNotes. com. *Structure and Physiology of Fungi.* 29 Dec 2010 <http://www.cliffsnotes.com/study_guide/topicArticleId-8524,articleId-8452.html>.

Cummings R. D., Doering T. L. 2009. Chapter 21. Fungi in Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY):

De Hoog, G. S., Hermanides-Nijhof E. J., 1977. The black yeasts and allied hyphomycetes. Studies in Mycology No. 15. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

Domsch, K. H., Gams W., Anderson T. H., 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press, London, UK.

Edison, L, Latimer K. S., Bain P. J., Roberts R. 2003. Canine and Feline Histoplasmosis. Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program

Eisenberg L. G., Goldman W. E. 1991. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis Clin. Microbiol. Rev. 4: 411–421.

Ellis, D. H. 1997. Zygomycetes. Chapter 16 In Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th edition Edward Arnold London pp247–277.

Fisher M. C., Koenig G. L., White T. J., Taylor L. W. 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia 94(1): 73–84.

Georgopapadakou N. H., Walsh T. J. 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies, Antimicrob. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40: 279–291

Gregory M. J. 2006. Biology Web. http://faculty.clintoncc.suny.edu/faculty/michael.gregory/

Griffith, H. Winter. 1995.Complete Guide to Symptoms, Illness & Surgery. Putnam Berkely Group

Guillot, J., E Gueho, M. Jesourd et al. 1996. Identification of Malassezia species. J. Mycol. Med. 6:103–110.

Hector R. F. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. Clinical Microbiology Reviews. 6(1): 1–21.

http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/athletesfoot.html

http://phil.cdc.gov/ Public Health Image Library (PHIL)] -- image #3935

http://supercurso.sld.cu/supercursos/plonearticlemultipage.2006-05-05.8777394061/tinea-unguium

http://supercurso.sld.cu/supercursos/plonearticlemultipage.2006-05-05.8777394061/tinea-corporis/tinea-cruris//tinea-barbae)

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Trichophyton/mentagrophytes.html

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Epidermophyton/

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Microsporum/Microsporum_gypseum.html

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Madurella/mycetomatis.html)

Kreger-Van Rij, N.J.W. (ed) 1984. The Yeasts: a taxonomic study. 3rd Edition. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Kwon-Chung, K. J., Bennett J. E., 1992. Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia and London.

Lam. S. 2008. Tinea capitis explained. Lam Institute for hair restauration. http://www.hairtx.com/hair-loss/hair-loss-disorders/tinea-capitis/

McGinnis, M. R. 1980. Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, London, UK.

Mochizuki, T. Pathogenic Fungi Database(PFDB), http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb

Naglik J. R., Challacombe S. J., Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 67: 400–428.

Naglik J. R., Rodgers C. A., Shirlaw P. J., Dobbie J. L., Fernandes-Naglik L. L., Greenspan D. et al. 2003. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. J Infect Dis 188: 469–479.

Porter, C. *Aspergillus* in SOIL MICROBIOLOGY. BIOL/CSES 4684

Rebell, G., Taplin. D. 1970. The Dermatophytes. 2nd. revised edition. University of Miami Press, Coral Gables, Florida. USA.

Reid B. J. 1998. *Exophiala werneckii* causing tinea nigra in Scotland. Br. J. Dermatol. 139 (1): 157–8.

Rippon, J. W. 1988. Medical Mycology. 3rd Edition. W.B. Saunders Co.

Samson, R.A., E.S. Hoekstra, and C.A.N. van Oorschot. 1984. Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

SparkNotes Editors. "SparkNote on Fungi." SparkNotes LLC. n.d.. http://www.sparknotes.com/biology/microorganisms/fungi/ (accessed December 16, 2010)

Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Vol. I , II. 1998. Ed. Lesslie Collier, A. Balows, M. Sussman.

Van Etten E. W., van de Rhee N. E., van Kampen K. M., Bakker-Woudenberg I. A. 1991. Effects of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 35(11): 2275–2281.

Volk. T, Mossman T. 2005. Tom Volk's Fungus of the Month for January 2005. http://TomVolkFungi.net

Volk. T. 2001. Tom Volk's Fungus of the Month for January 2001. http://TomVolkFungi.net

Volk. T. 2002. Tom Volk's Fungus of the Month for January 2002. http://TomVolkFungi.net

Weitzman J. Summerbell R. C. 1995. The dermatophytes – Clin. Microbiol. Rev. 8: 240–259.

White T. C., Marr K. A., Bowden R. A., 1998. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance – Cli. Microbiol. Rev. April 11: 382–402.

Xavier M. H., Ribeiro L. H., Duarte H., Saraça G., Souza A. C. L. 2008. Dermatoscopy in the diagnosis of tinea nigra. Dermatology Online Journal 14 (8): 15.

BCU

Prescurtări

Ac	= anticorpi
ADCC (antibody dependent cell cytotoxicity)	= citotoxicitate dependentă de anticorpi
AGMK (African green monkey kidney)	= rinichi de maimuță verde africană
ALT	= alanin-aminotransferază
AMPc	= adenozin-monofosfatul ciclic
AST	= aspartat-aminotransferază
ATL	= leucemia adultului cu celule T
B	= bazofile
BIV	= virusul imunodeficienței bovinelor
CAEV	= virusul artritei și encefalopatiei caprinelor
CD	= celulă dendritică
CDI	= celule dendritice interstițiale
CDm	= celule dendritice mieloide
CDp	= celule dendritice plasmocitoide
CDU	= celule diploide umane
CHC	= carcinom hepatocelular
CI	= complexe imune
CMD	= cardio-miopatie dilatativă
CMV	= virusul citomegalic
CPA	= celule prezentatoare de antigen
cp	= citopatic
CRS	= sindromul congenital al rubeolei umane
dc	= dublu catenar
DI	= virioni defectivi interferenți
E	= eozinofile
EBNA (Epstein Barr nuclear antigen)	= antigenul nuclear al virusului Epstein Barr
ECM	= matrice extracelulară
ECP	= efect citopatic
EF	= electroforeză
EGF (epidermal growth factor)	= factorul de creștere al celulelor epidermice
EIAV	= virusul anemiei cronice recurente a equinelor
Ek	= celule eucariote
EMR	= endocitoză mediată de receptori
FGF (fibroblast growth factor)	= factorul de creștere al fibroblastelor
FIV	= virusul imunodeficienței felinelor
FSH	= hormonul foliculo-stimulator
gsi	= gastro-intestinal
GST	= gene supresoare ale creșterii tumorale
HA	= hemaglutinină
HAI	= reacția de hemaglutinoinhibare
HNIG	= human nonspecific IgG (IgG umană nespecifică)
HIV	= virusul imunodeficienței umane
HPV	= virusul papiloma uman
HRIG	= imunoglobulină antirabică umană
HSV	= herpes simplex virus
HTLV	= human T lymphotropic virus
ic	= intracerebral
ICNV	= comitetul internațional pentru nomenclatura virusurilor

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IDDM	= diabetus melitus insulino-dependent
IFA	= anticorpi imunofluorescenți
IFD	= imunofluorescență directă
IFN	= interferoni
Ig	= imunoglobuline
IG	= fracția γ a serului
IGF-1 (insulin-like growth factor 1)	= factorul de creștere asemănător insulinei
IMC	= imunitate mediată celular
IMH	= imunitate mediată humoral
IRES (internal ribosome entry site)	= situs intern de intrare a ribosomilor
iv	= intravenos
IVIG	= preparatul fracției γ a serului pentru administrare intravenoasă
LCMV	= virusul coriomeningitei limfocitare
LCR	= lichid cefalorahidian
LTR (Long Terminal Repeats)	= secvențe lungi repetate terminal
MALT	= țesut limfoid asociat mucoaselor
mc	= monocatenar
MBL (manose binding lectin)	= lectina care leagă manoza
MC	= moluscum contagiosum
MCV	= virusul moluscum contagiosum
MI	= mononucleoză infecțioasă
ME	= microscopie electronică
MO	= măduva osoasă
N	= neutrofile
NA	= neuraminidază
ncp	= necitopatic
NK (natural killer)	= celule ucigașe naturale
NSin	= nesincițiale
NP	= nucleoproteină
nt	= nucleotide
OLS	= organe limfoide secundare
ORF (open reading frame)	= cadru deschis de citire
PDGF (platelet derived growth factor)	= factorul de creștere derivat din plachete
PKR	= fosfokinaza dependentă de ARN
PAMP (pathogen associated molecular patterns)	= tabloul molecular asociat patogenilor
PHA	= fitohemaglutinină
PRP	= panencefalita rubeolică progresivă
PRR (pattern recognition receptors)	= tabloul receptorilor de recunoaștere
Rb	= retinoblastom (tumoră retiniană la vârsta copilăriei)
ren	= reticul endoplasmic neted
reg	= reticul endoplasmic granular
RFC	= reacția de fixare a complementului
RI	= răspunsul imun
RIMH	= răspunsul imun mediat humoral
RIMC	= răspunsul imun mediat celular
RNP	= ribonucleoproteină
ROI	= radicalii reducerii intermediare a oxigenului
SARS	= sindromul acut respirator sever
SCID	= imunodeficiență severă combinată
SFM	= sistemul fagocitar mononuclear
SI	= sistemul imunitar
Sin	= sincițiale
SIV	= virusul imunodeficienței maimuțelor
SLAM	= moleculă specifică a activării limfocitelor
SNC	= sistem nervos central
TGFb (transforming frowth factor b)	= factorul b stimulator al creșterii celulelor transformate malign
TLR	= Toll like recetors
Tm (melting temperature)	= temperatura de denaturare a ADN dublu catenar

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TNF	= factorul de necroză tisulară (tumorală)
Toll	= proteină transmembranară cu secvențe extracelulare repetitive bogate în leucină și un domeniu intracelular
ts	= termosensibil
VEB	= virusul Epstein Barr
VEJ	= virusul encefalitei japoneze
VHA	= virusul hepatitei A
VHB	= virusul hepatitei B
VHC	= virusul hepatitei C
VRS	= virusul respirator sincițial
VSR	= virusul sarcomului Rous
VZV	= virusul varicela zoster

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTECA DE MEDICINĂ
Cota veche | Prețul
88,5 Lei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9 789737 379856

LeiN 88.50